

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Srđan Z. Bošković

**Karakterizacija gena *ankrd1a*, *ankrd1b* i
ankrd2 zebrice (*Danio rerio*) u razviću i
odgovoru na stres**

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Srđan Z. Bošković

**Characterization of zebrafish *ankrd1a*,
ankrd1b and *ankrd2* genes in development
and stress response**

doctoral dissertation

Belgrade, 2021

Mentori:

dr Snežana Kojić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Dragica Radojković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Komisija:

prof. dr Gordana Matić, redovni profesor i naučni savetnik u penziji

prof. dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

prof. dr Goran Brajušković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Dragica Radojković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Snežana Kojić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane:

Zahvalnica

Eksperimentalni rad u okviru ove doktorske teze započet je 2015. godine u Laboratoriji za molekularnu biologiju instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, pod mentorstvom dr Snežane Kojić i dr Dragice Radojković.

Zahvalan sam dr Snežani Kojić, strpljivoj mentorki i naučnici sa neiscrpnim entuzijazmom, na prenešenom znanju, dugim diskusijama, posvećenosti i punoj podršci tokom izrade ove doktorske teze.

Zahvalan sam dr Dragici Radojković na korisnim savjetima tokom rada i pisanja teze kao i na podršci koju mi je pružala još od izrade diplomskog rada u Laboratoriji za molekularnu biologiju.

Zahvaljujem svojim profesorima i članovima komisije: prof. dr Gordani Matić, prof. dr Dušanki Savić-Pavićević i prof. dr Goranu Brajuškoviću na korisnim savjetima tokom studija i pisanja ove teze.

Kolegama iz laboratorije sam zahvalan na svakodnevnoj podršci, razmjeni znanja i iskustva i pomoći kad „zaškripi“.

Tokom rada na ovoj tezi, imao sam privilegiju da još jednu laboratoriju doživim kao svoju: Laboratoriju za genetiku razvića, u Institutu Maks Plank za proučavanje srca i pluća (Bad Nauheim, Njemačka). Rad u laboratoriji Prof. dr Didiera YR Stainiera promijenio je moj doživljaj nauke i za mene je neprocjenjivo iskustvo. Zahvalan sam Profesoru na pruženoj prilici i svim kolegama iz laboratorije od kojih sam mnogo naučio.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Rubénu Marín Juezu, kojeg takođe smatram svojim mentorom i kojem sam se često obraćao za pomoć u radu.

Zahvalan sam dr Svenu Reischaueru, koji je podijelio sa nama protokol forsiranog plivanja u viru korišćen u ovoj studiji.

Moja velika sreća je što imam porodicu koja me je uvijek podržavala. Posebno hvala onim članovima koji me trpe svakodnevno: Svetlani i Filipu.

Srđan Bošković

Karakterizacija gena *ankrd1a*, *ankrd1b* i *ankrd2* zebriće (*Danio rerio*) u razviću i odgovoru na stres

Sažetak

U popriječno-prugastim mišićima članovi familije mišićnih proteina sa ankirinskim ponovcima (eng. *Muscle Ankyrin Repeat Proteins*, MARP) učestvuju u mehanotransdukciji signala sa sarkomere u jedro, gdje modulišu ekspresiju ciljnih gena. Ekspimirani su tokom razvića srca i skeletnih mišića, povećanog mehaničkog opterećenja ovih organa i u patološkim stanjima poput infarkta miokarda i miopatija. Smatra se da ovi proteini imaju ulogu u adaptaciji mišićne ćelije na stres, ali je ona i dalje nedovoljno istražena. Kako bi upotpunili znanje o MARP familiji, njeni članovi proučavani su u zebrići, model organizmu naročito pogodnom za *in vivo* analizu razvića, genetičke manipulacije i proučavanje mehanizama regeneracije. Ekspresija ortologa *MARP* gena zebriće (*ankrd1a*, *ankrd1b* i *ankrd2*) analizirana je tokom razvića i u odgovoru na dvije vrste stresa: povećanu fizičku aktivnost i povredu srca. Generisanje mutanata za *MARP* gene omogućilo je njihovu funkcionalnu analizu u ovim procesima. Određen je profil ekspresije *MARP* gena tokom razvića zebriće, od embriona do adulta, a reporterska linija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* pružila je uvid u ekspresiju *ankrd1a* sa visokom rezolucijom. Povećana fizička aktivnost indukovala je ekspresiju *MARP* gena u srcu i skeletnim mišićima zebriće. Ekspresija *ankrd1a* je povećana u kardiomiocitima graničnog regiona povrede i zavisna od stadijuma remodelovanja miokarda u regenerišućem srcu. Iako mutacije u *MARP* genima nisu dovele do očigledne promjene fenotipa, kod adultnih jedinki zebriće genotipa *ankrd1a*^{-/-} primjećena je smanjena proliferacija kardiomiocita nakon povrede srca, ali bez uticaja na konačni ishod regeneracije. Ovim istraživanjem napravljen je ključni korak ka uspostavljanju zebriće kao model organizma za proučavanje funkcije članova MARP familije.

Ključne riječi: zebrića, *ANKRD1*, *ANKRD2*, srce, skeletni mišić, razviće, regeneracija, stres

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

Characterization of zebrafish *ankrd1a*, *ankrd1b* and *ankrd2* genes in development and stress response

Abstract

Members of the muscle ankyrin repeat protein (MARPs) family in striated muscles play a role in mechanotransduction of signals from the sarcomere to the nucleus, where they modulate expression of target genes. MARPs are expressed during heart and skeletal muscle development, increased mechanical load and in pathological conditions such as myocardial infarction and myopathies. Their presumed role in muscle adaptation to stress remains poorly understood. To extend our knowledge of the MARP family members, they were studied in the zebrafish, a model organism well suited for developmental and regeneration studies, as well as genetic manipulations. Expression of zebrafish *MARP* gene orthologues (*ankrd1a*, *ankrd1b*, *ankrd2*) was analysed during development and in response to two types of stress: increased physical activity and cardiac injury. Introduction of mutations in the *MARP* family genes allowed for functional analysis of its members in these processes. Expression profile of *MARP* genes during zebrafish development was determined in stages from embryo to adult, while the transgenic reporter line *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* provided tracking of *ankrd1a* expression with higher resolution. Increased physical activity induced the expression of *MARP* genes in zebrafish heart and skeletal muscles. Expression of *ankrd1a* was found increased in the injury border zone cardiomyocytes and dependent on myocardium remodelling stage in the regenerating heart. Although mutations in *MARP* genes did not cause phenotype alterations, a lower rate of cardiomyocytes proliferation was observed in *ankrd1a*^{-/-} zebrafish following cardiac injury, but with no effect on the regeneration outcome. This study is a key step towards establishing the zebrafish as a model organism for functional studies of the MARP family.

Keywords: zebrafish, *ANKRD1*, *ANKRD2*, heart, skeletal muscle, development, regeneration, stress

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Familija proteina MARP	1
1.1.1. Familija proteina MARP i stres	3
1.2. Zebrica kao model sistem	4
1.2.1. Razviće zebrice	5
1.2.2. Razviće skeletnih mišića zebrice	6
1.2.3. Razviće srca zebrice	7
1.2.4. Alati za genetičke manipulacije u zebrici	9
1.2.4.1. Transgene linije zebrice	9
1.2.4.2. CRISPR/Cas9 mutageneza	11
1.2.5. Trening i modelovanje povećane fizičke aktivnosti zebrice	12
1.2.6. Regeneracija srca zebrice	13
2. Ciljevi	15
3. Materijal i metode	16
3.1. Materijal	16
3.1.1. Graničnici	16
3.1.2. Antitijela	18
3.1.3. Rastvori i puferi	19
3.1.4. Eksperimentalne životinje	19
3.1.4.1. Uzgajanje zebrica	20
3.1.4.2. Mriješćenje zebrica	20
3.1.4.3. Anestezija zebrica	20
3.1.4.4. Žrtvovanje zebrica	20
3.1.5. Bakterije	20
3.2. Metode	20
3.2.1. Bioinformatička analiza sekvenci gena i proteina	20
3.2.2. Genetičke manipulacije	22
3.2.2.1. Generisanje transgene linije <i>TgBAC(ankrd1a:EGFP)^{bns505}</i>	22
3.2.2.1.1. Sinteza konstrukta <i>BAC(ankrd1a:EGFP)</i>	22
3.2.2.1.2. Izolacija molekula BAC DNK	25
3.2.2.1.3. Sinteza molekula iRNK transpozaze Tol2	25
3.2.2.1.4. Injektiranje embriona zebrice i selekcija transgenih jedinki	26
3.2.2.2. Generisanje mutanata tehnologijom CRISPR/Cas9	26
3.2.2.2.1. Sinteza gRNK	26

3.2.2.2.1.1. Linearizacija plazmida pT7-gRNA.....	27
3.2.2.2.1.2. Hibridizacija oligonukleotida	27
3.2.2.2.1.3. Kloniranje dvolančanog fragmenta DNK u plazmid pT7-gRNA.....	27
3.2.2.2.1.4. <i>In vitro</i> sinteza gRNK.....	28
3.2.2.2.2. Sinteza iRNK za Cas9	29
3.2.2.2.3. Injektiranje gRNK i iRNK za Cas9 u embrione zebrice	29
3.2.2.2.4. Genotipizacija mutanata	29
3.2.2.2.4.1. Izolacija genomske DNK iz embriona zebrice	30
3.2.2.2.4.2. Analiza krive topljenja DNK visoke rezolucije (HRMA)	30
3.2.2.2.4.3. Sekvenciranje molekula DNK	30
3.2.3. Manipulacije adultnim jedinkama zebrice.....	31
3.2.3.1. Trening zebrica forsiranim plivanjem u viru	31
3.2.3.2. Kriopovreda srca zebrice	31
3.2.4. Analiza ekspresije gena na nivou molekula RNK metodom RT-qPCR	32
3.2.4.1 Izolacija molekula RNK.....	32
3.2.4.2. Sinteza molekula cDNK.....	32
3.2.4.3. Kvantitativni PCR u realnom vremenu	33
3.2.5. Lokalizacija transkripta <i>in situ</i> RNK hibridizacijom.....	33
3.2.5.1. Kloniranje proba za <i>in situ</i> RNK hibridizaciju	33
3.2.5.2. Sinteza RNK proba obilježenih DIG-om	34
3.2.5.3. <i>In situ</i> RNK hibridizacija na embrionima i larvama zebrice	34
3.2.5.4. <i>In situ</i> RNK hibridizacija na presjecima smrznutog srca.....	35
3.2.6. Histološka bojenja	35
3.2.6.1. Imunohistohemijska detekcija proteina larvi zebrice.....	35
3.2.6.2. Imunohistohemijska detekcija proteina na presjecima smrznutog srca zebrice	36
3.2.6.3. Bojenje metodom A.F.O.G.	36
3.2.7. Mikroskopija i obrada slika	36
3.2.7.1. Priprema embriona i larvi zebrice za <i>in vivo</i> mikroskopiju	36
3.2.7.2. Priprema adutnih jedinki i tkiva zebrice za mikroskopiju	36
3.2.7.3. Svjetlosna, fluorescentna i konfokalna mikroskopija	37
3.2.7.4. Obrada slika	37
3.2.8. Kvantifikacija proliferacije kardiomiocita.....	37
3.2.9. Statistička analiza	37

4. Rezultati.....

4.1. Bioinformatička analiza gena i proteina familije MARP	38
------------------------------------------------------------------	----

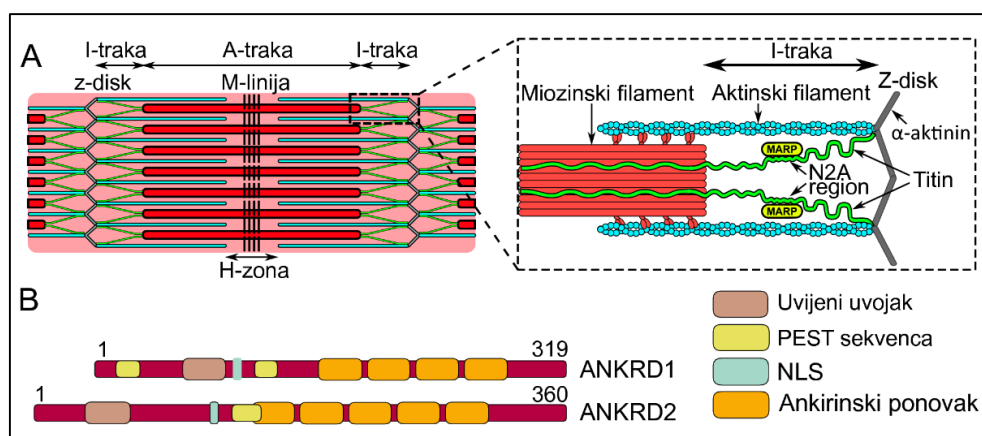
4.2. Ekspresija gena <i>MARP</i> zebrice.....	43
4.2.1. Ekspresija gena <i>MARP</i> tokom razvića zebrice	43
4.2.2. Ekspresija gena <i>MARP</i> u srcu i skeletnim mišićima adultnih jedinki zebrice.....	45
4.3. Praćenje dinamike i lokalizacije ekspresije <i>ankrd1a</i> u transgenoj liniji zebrice <i>TgBAC(ankrd1a:EGFP)</i>	45
4.3.1. Ekspresija <i>TgBAC(ankrd1a:EGFP)</i> tokom razvića zebrice	45
4.3.2. Ekspresija <i>TgBAC(ankrd1a:EGFP)</i> u skeletnim mišićima i srcu adultnih jedinki zebrice	50
4.4. Ekspresija gena <i>MARP</i> zebrice u uslovima povećane fizičke aktivnosti	51
4.4.1. Uticaj forsiranog plivanja u viru na ekspresiju gena u skeletnim mišićima i srcu	52
4.4.2. Ekspresioni odgovor gena <i>MARP</i> zebrice na forsirano plivanje u viru.....	54
4.5. Ekspresija gena <i>ankrd1a</i> u povrijeđenom srcu adultne jedinke zebrice	56
4.5.1. Kvantifikacija i lokalizacija ekspresije gena <i>ankrd1a</i> u srcu zebrice nakon kriopovrede	56
4.5.2. Ekspresija <i>TgBAC(ankrd1a:EGFP)</i> u srcu zebrice nakon kriopovrede	58
4.5.3. Ekspresija <i>TgBAC(ankrd1a:EGFP)</i> u djelimično regenerisanim srcima zebrice.....	59
4.6. Uloga gena <i>MARP</i> u razviću zebrice i regeneraciji srca nakon kriopovrede	61
4.6.1. Analiza fenotipa zebrica sa mutacijama u pojedinačnim genima <i>MARP</i>	61
4.6.2. Proliferacija kardiomiocita zebrice <i>ankrd1a^{-/-}</i> nakon kriopovrede.....	63
4.6.3. Uklanjanje ožiljka tokom regeneracije srca kod <i>ankrd1a^{-/-}</i> zebrica	64
5. Diskusija	66
5.1. Evoluciona očuvanost strukture ortologa <i>MARP</i>	66
5.2. Ekspresioni profil gena <i>MARP</i> zebrice	67
5.3. Praćenje ekspresije <i>ankrd1a</i> u reporterskoj liniji zebrice <i>TgBAC(ankrd1a:EGFP)</i>	67
5.4. Uloga gena <i>MARP</i> familije u razviću zebrice	69
5.5. Modelovanje povećane fizičke aktivnosti i njen uticaj na ekspresiju gena <i>MARP</i> zebrice	69
5.6. Ekspresija gena <i>MARP</i> u toku regeneracije srca zebrice	70
5.7. Uloga gena familije <i>MARP</i> u regeneraciji srca zebrice.....	71
6. Zaključci	74
7. Literatura	75

1. Uvod

1.1. Familija proteina MARP

Popriječno-prugasti mišići odlikuju se izuzetnom sposobnošću remodelovanja u odgovoru na stres. Prilagođavajući se novim uslovima, mišićna vlakna mogu mijenjati svoje fiziološke, morfološke i biohemijske karakteristike, a time i mišićnu masu, kontraktilna svojstva i metabolički status. Nakon odgovarajućeg stimulusa, sa senzornih kompleksa započinje transdukcija signala duž signalnih puteva do faktora koji modulišu ekspresiju gena (1). Jedan od stimulusa kojem su kontraktilne mišićne ćelije konstantno izložene je mehanički stimulus. U procesu mehanosenzacije, mehanički stimulus se pretvara u biohemijski signal koji se dalje prenosi niz odgovarajuće unutarćelijske signalne puteve do konačnog efektoru u jedru ili sarkomeri (2,3). Za mišićnu ćeliju, važnu ulogu u mehanosenzaciji ima molekul titina i sa njim asocirani proteinski kompleksi, signalozomi, lokalizovani u Z-disku, M-liniji i I-traci sarkomere. Jedna od komponenti kompleksa osjetljivog na stres, koji se nalazi u I-traci, su članovi mišićne familije proteina sa ankirinskim ponovcima (od eng. *Muscle Ankyrin Repeat Protein*, MARP) (Slika 1A), slični u proteinskoj strukturi i lokalizaciji unutar ćelije. Familija MARP sisara obuhvata tri člana: ANKRD1, ANKRD2 i DARP (4).

Članovi familije MARP identifikovani su u nekoliko odvojenih studija. ANKRD1 (tada označen kao protein C-193, poznat i kao CARP) identifikovan je kao protein čija je ekspresija indukovana citokinima u ćelijama endotela (5). Nakupljanje transkripta *Ankrd1* opisano je nakon denervacije skeletnog mišića, kao i tokom morfogeneze mišića, u primarnim miotubama miša (6). U neonatalnim kardiomiocitima pacova, transkript *Ankrd1* je konstitutivno eksprimiran u srcu i njegov nivo je osjetljiv na tretman doksorubicinom (7). *Ankrd2* identifikovan je zahvaljujući povišenoj ekspresiji nakon mehaničkog istezanja mišića miša (8), a nedugo nakon toga okarakterisan je i ortolog čovjeka (9). *DARP* je najmanje izučen član familije MARP. Njegova ekspresija je povišena nakon metaboličkog stresa mišića (10). Nakon karakterizacije proteina MARP, ustanovljeno je da posjeduju zajedničke domene i motive, kao što su sekvenca PEST (signal za brzu degradaciju), signalna sekvenca za lokalizaciju u jedro (eng. *nuclear localization signal*, NLS) i 4 ankirinska ponovka na C-terminusu proteina (Slika 1 B), kao i da svi imaju dvojni lokalizaciju unutar ćelije. Detektovani su kako u jedru, tako i u I-traci sarkomere, gdje kolokalizuju sa N2A regionom titina. Zbog navedenih sličnosti svrstani su u familiju proteina MARP (11).



Slika 1. Šematski prikaz strukture sarkomere i proteina MARP familije. (A) Sarkomera sa istaknutim zonama (lijevo) i I-traka sa prikazanim pozicijama proteina sarkomere i MARP familije (desno). (B) Struktura proteina ANKRD1 i ANKRD2 čovjeka sa istaknutim domenima i motivima. NLS=signal za lokalizaciju u jedro.

Primarno mjesto ekspresije gena *MARP* su mišićne ćelije, ali im se zastupljenost razlikuje u srcu i skeletnim mišićima. Tokom razvića miševa i pacova, *Ankrd1* je eksprimiran u ranim fazama razvića

srca, u ćelijama miokarda, od 8,5 dana nakon začeća (E8,5). Ekspresija je aktivna i u srcu adulta. Od stadijuma E11,5 ekspresija se javlja u miotomu i nekim skeletnim mišićima, ali je uvijek niža od one u srcu. Niža ekspresija je detektabilna u većim krvnim sudovima, plućima, jetri i koži (6,12). Kod čovjeka je ekspresija *ANKRD1* detektovana u fetalnom srcu i skeletnim mišićima, dok je kod adulta ona uglavnom prisutna u srcu, ali je ekspresija takođe vidljiva u pojedinim vlaknima skeletnih mišića (13). Sa druge strane, *Ankrd2* je eksprimiran u miotomu glodara od E9,5 a kasnije u pojedinim skeletnim mišićima, dok u srcu nije detektovana njegova ekspresija (8). *In vitro* studije su pokazale da ekspresija *Ankrd2* u mioblastima miša C2C12 raste uporedo sa njihovom diferencijacijom u multijedarne miotube (9). Kod čovjeka, ekspresija *ANKRD2* je detektabilna u fetalnim skeletnim mišićima od 10. nedjelje razvića, dok je u srcu prisutna samo u tragovima. Kod adulta, ekspresija je prisutna u skeletnim mišićima i u manjoj mjeri u komorama srca. Rezultati imunohistohemijskih analiza pokazali su da je *ANKRD2* uglavnom, mada ne ekskluzivno, eksprimiran u mišićnim vlaknima tipa I (spora mišićna vlakna), i da na popriječnim presjecima mišića imunobojenje pokazuje karakterističan šablon nalik rasporedu polja na šahovskoj tabli. Osim u navedenim tkivima, *ANKRD2* se u manjoj mjeri eksprimira u bubrežima i prostati (9,13,14).

Dosadašnje *in vivo* i *in vitro* studije ukazuju da je ekspresija gena *MARP* pod kontrolom nekoliko prominentnih transkripcionih regulatora važnih za rast i diferencijaciju mišićnih ćelija. Analiza miševa genotipa *Nkx2-5^{-/-}* pokazala je da je *Ankrd1* pod transkripcionom regulacijom *Nkx2-5* signalnog puta tokom razvića srca (12). *Nkx2-5* djelimično realizuje svoj uticaj i u sadejstvu sa *GATA-4* za koji postoje predviđena mjesta vezivanja u proksimalnom promotoru *Ankrd1* (15). Regulatorni protein transkripcije *p53* reguliše ekspresiju *Ankrd1* u C2C12 mioblastima. *Ankrd1* sa svoje strane pozitivno reguliše aktivnosti *p53* (16). Promotor *Ankrd1* posjeduje vezujuća mjesta za *Sp3* i pod uticajem je ovog regulatornog proteina transkripcije tokom razvića komora srca miša (17). *Ankrd2* je takođe pod uticajem *Nkx2-5* i *p53* koji aktiviraju ekspresiju ovog gena (18). Promotori *Ankrd1* i *Ankrd2* mete su aktivnosti miogenih regulatornih faktora, *MyoD* i miogenina, i regulatornog proteina transkripcije *Mef-2* tokom diferencijacije C2C12 mioblasta u miotube (19,20).

Ankrd1 moduliše ekspresiju gena u kardiomiocitima, uglavnom u pravcu inhibicije transkripcije. Prekomjerna ekspresija *Ankrd1* u kardiomiocitima pacova rezultirala je inhibicijom transkripcije srčanog troponina C i atrijalnog natriuretskog faktora (ANF) (7). Isti efekat ima i na ekspresiju reportera sa minimalnog promotora koji sadrži HF-1 element, regulatornu sekvencu odgovornu za tkivno-specifičnu ekspresiju u komori srca (12). *Ankrd1* fuzionisan sa Gal4-DNK vezujućim domenom u stanju je da inhibira ekspresiju sa minimalnog promotora koji sadrži GAL4 vezujuća mjesta u kardiomiocitima i fibroblastima, ukazujući da sam *Ankrd1* sadrži domen koji djeluje kao transkripcioni represor i da može djelovati nezavisno od transkripcionih regulatora specifičnih za mišićne ćelije (7,12). Među identifikovanim interagujućim partnerima *Ankrd1* nalaze se strukturni i regulatorni proteini poput: titina, kalsekvestrina, *p53*, YB-1, miopaladina i drugih (21).

Utišavanje ekspresije *ANKRD2* u primarnim miotubama čovjeka dovelo je do izmjene ekspresije niza gena povezanih sa, između ostalog, metabolizmom, regulacijom ćelijskog ciklusa, replikacijom i reparacijom molekula DNK (18). *Ankrd2* u mišićnoj ćeliji interaguje sa YB-1, *p53* i PML, a u stanju je, makar u *in vitro* uslovima, da fizički veže veći broj proteina sa PDZ domenima koji učestvuju u organizaciji signalnih kompleksa, kao i neke transkripcione faktore važne za razvoj srca, poput *HAND2* (18,22).

Pomenuti primjeri regulacije ekspresije i međuproteinskih interakcija članova familije *MARP*, kao i njihova dvojna lokalizacija unutar ćelije, ukazuju da oni imaju svoju ulogu u brojnim signalnim putevima važnim za razvoj i funkcionisanje mišićnih ćelija.

1.1.1. Familija proteina MARP i stres

Zajednička karakteristika članova familije *MARP* je brza promjena nivoa ekspresije tokom odgovora mišićne ćelije na stres. Ovakva reaktivnost ustanovljena je u skeletnim mišićima i srcu nakon stresa koji pokreće fiziološku adaptaciju tkiva, ali i u patološkim stanjima u kojima je funkcija mišićnog tkiva narušena (21).

Proteini familije *MARP* proučavani su u kontekstu reakcije skeletnog mišića na različite forme kontrakcija: ecentrične, koncentrične i izometrijske. Kod ecentričnih kontrakcija dolazi do istezanja mišića jer je sila koja djeluje na mišić veća od sile kojom se on odupire istezanju. Koncentričnim kontrakcijama mišić se skraćuje nasuprot sili koja na njega djeluje. Kod izometrijskih kontrakcija nema promjene dužine mišića, jer je sila istezanja jednaka sili kojom se mišić odupire. Modelovanje različitih formi povećane aktivnosti skeletnih mišića glodara pokazalo je da je ekspresija *Ankrd1* i *Ankrd2* naročito podložna uticaju ecentričnih kontrakcija koje indukuju povišene nivoe transkripata nakon 6 sati od izvođenja serije kontrakcija (23,24). Hentzen i saradnici pokazali su da ekspresija *Ankrd1* pozitivno koreliše sa momentom sile koju mišić generiše, a koja je ujedno najviša kod ecentričnog tipa kontrakcija. Na potencijalno različite mehanizme mehanotransdukcije u kojima *Ankrd1* i *Ankrd2* sudjeluju ukazalo je i to što je promjena ekspresije *Ankrd1* zavisila od intenziteta i tipa kontrakcije (ecentrična ili izometrijska), dok je ekspresija *Ankrd2* zavisila od tipa kontrakcije, ali ne i od njenog intenziteta (25). Kao što je već pomenuto, istezanje mišića na duži period dovoljno je za indukciju povećane ekspresije *Ankrd2* (8). Slično kao kod glodara, ekspresija *ANKRDI* u skeletnim mišićima čovjeka raste nakon samo 3 sata od stresa mišića izazvanog iscrpljujućim kontrakcijama kombinovanog tipa (ecentrične i koncentrične) (26). U drastičnijem primjeru narušavanja integriteta tkiva skeletnih mišića, jedarna akumulacija *Ankrd2* primjećena je u mišićnim ćelijama nakon povrede mišića ubrizgavanjem kardiotoksina i smrzavanjem suvim ledom. Ćelije koje su pokazivale karakterističnu promjenu ekspresije i lokalizacije proteina *Ankrd2* nalazile su se uz teško oštećene ćelije pogođene tretmanom (27). Povećanje nivoa i odstupanje od šablona bazalne ekspresije gena *MARP* opisano je kod mišićnih i neurodegenerativnih bolesti čovjeka. Ove promjene nisu uniformne kod svih patoloških stanja i zavise od tipa, a potencijalno i od stadijuma bolesti. Izmenjena ekspresija *ANKRDI* i *ANKRD2* detektovana je u mišićnim ćelijama oboljelih od amiotrofične lateralne skleroze (ALS), spinalne mišićne atrofije (SMA), i različitih formi kongenitalne miopatije i mišićne distrofije (28–31).

Različiti vidovi stresa srčanog mišića naročito utiču na povećanje ekspresije *Ankrd1*. Eksperimentalno izazvano opterećenje srca kod glodara, kao što je transverzalna konstrikcija aorte (TKA) i indukovana hipertenzija, dovode do povećane ekspresije *Ankrd1* koja koreliše sa hipertrofijom srca (15,32). Povećana ekspresija *ANKRDI* i *ANKRD2* zabilježena je i u komori srca pacijenata sa srčanom insuficijencijom, kao posljedicom dilatirane kardiomiopatije ili aritmogene kardiomiopatije desne komore. Ekspresija *ANKRDI* pozitivno je korelisala sa ehokardiografski utvrđenom krutošću zida komore i progresijom bolesti (33–36). Analizom i poređenjem ekspresije gena nakon infarkta miokarda utvrđena je identična lokalizacija ekspresije *ANKRDI* u kardiomiocitima graničnog regiona povrede kod čovjeka i miša (37).

Iz navedenog se vidi da promjene u profilu ekspresije gena *MARP* u mišićnim ćelijama prate povećano opterećenje mišića, narušavanje njegovog integriteta i slabljenje njegove fiziološke funkcije, ukazujući na potencijalnu ulogu proteina *MARP* u adaptaciji i remodelovanju popriječno-prugastih mišića.

Uprkos funkciji pretpostavljenoj na osnovu profila ekspresije tokom razvika i odgovora na stres, „*knockout*“ miševi za sva tri gena *MARP* (*MKO*) nisu pokazivali vidljivu promjenu fenotipa u bazalnim uslovima. Razlike su bile suptilne i ogledale su se u većoj dužini sarkomere, ekspresiji duže izoforme titina, manjoj napetosti vlakna i većem gubitku momenta sile mišića nakon uzastopnih

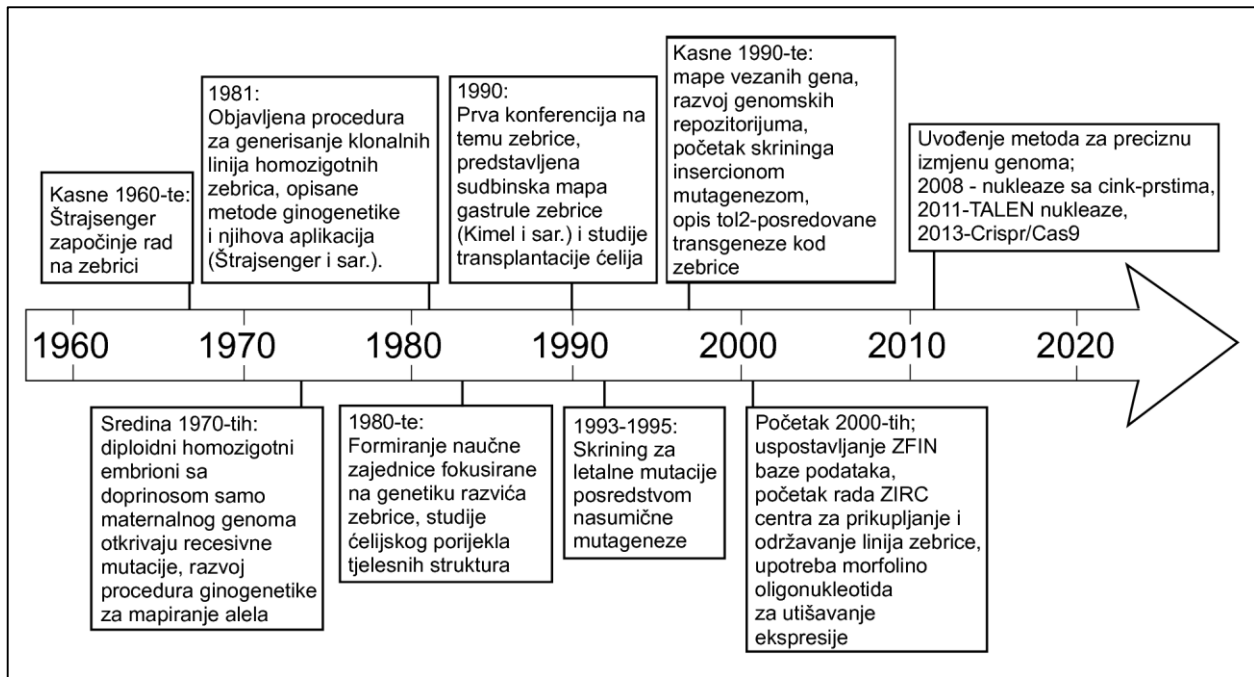
kontrakcija, mada uz oporavak sličan onom kod jedinki divljeg soja (eng. *wild type*, *WT*). Ovi rezultati ukazuju da proteini MARP učestvuju u održavanju pasivnih mehaničkih svojstava mišićnog vlakna (38). Srčana funkcija takođe nije narušena kod miševa *MKO*. Nakon procedure TKA i posljedičnog povećanog pritiska na srčani mišić, jedinke *MKO* pokazivale su slične nivoe hipertrofije komore kao i jedinke *WT* (39). U odvojenoj studiji na miševima *Ankrd1*^{-/-} potvrđen je rezultat sa hipertrofijom srca nakon procedure TKA postignut sa miševima *MKO*. Međutim, indukcija hipertrofije komore fenilefrinom izostala je kod jedinki *Ankrd1*^{-/-}. Ovaj rezultat vjerovatno je posljedica narušenog signalnog proteinskog kompleksa u I-traci, što se ogledalo u narušenoj translokaciji fosforilisanog kompleksa *Ankrd1/Erk/Gata4* sa sarkomere u jedro, smanjenoj ekspresiji *Fhl-1* (četri i po LIM domena-1) i fetalnih gena *Anp* (atrijski natriuretički peptid), β -*Mhc* (teški lanac miozina beta) i *Acta1* (alfa 1 aktin) (40). Isti mutanti *Ankrd1*^{-/-} imaju narušeno zarastanje rana kože koje se povezuje sa poremećenom funkcijom fibroblasta (41).

Rezultati prethodno navedenih istraživanja ukazuju da proteini MARP učestvuju u procesu adaptacije na stres i remodelovanju skeletnih mišića i srca. Kako bi izbjegli ograničenja koja nosi rad sa sisarskim modelima, opredjelili smo se za nastavak izučavanja porodice MARP na zebreci, kao model organizmu koji nudi značajne prednosti u genetičkim manipulacijama i *in vivo* analizi. Oslanjajući se na dosadašnja saznanja o evoluciono očuvanim biološkim procesima kod zebre i tehnikama njihovog proučavanja, pretpostavili smo da će zebra doprinijeti proširenju spektra eksperimentalnih manipulacija i analiza kako bi se produbilo znanje o ulozi članova porodice MARP u razviću i odgovoru mišića na stres.

1.2. Zebra kao model sistem

Zebra, *Danio rerio* (Hamilton, 1822), je slatkovodna riba iz porodice ciprinida. Adulti zebre veličine su do 40 mm i karakteriše ih, između ostalog, 6-7 tamno plavih traka duž tijela, po kojima su i dobile ime. Njihovo prirodno stanište su plitke stajaće vode u južnoj i jugoistočnoj Aziji. Zebra je omnivor, socijalna životinja koja živi u grupama, otporna na variranje uslova životne sredine, sa životnim vijekom u laboratorijskim uslovima od oko 42 mjeseca (42).

Početak korišćenja zebre kao model organizma vezuje se za rad Džordža Štrajnsengera, započet kasnih 1960-tih godina, koji je sa svojim saradnicima razvio metodu za generisanje diploidnih zebra bez doprinosa genetičkog materijala mužjaka (ginogeneza) (Slika 2) (43). Ovaj moćan genetički alat omogućio je lako praćenje i mapiranje recesivnih alela. Dalja afirmacija zebre kao model sistema nastavljena je kroz rad Čarlsa Kimela, Monte Vesterfilda, Kristine Nilsen-Volhart i drugih čiji je fokus istraživanja prevashodno bio razviće nervnog sistema i uspostavljanje generalnog tjelesnog plana u toku embrionalnog razvića (44). Fenotipski skrining nakon nasumične mutageneze (tzv. „*forward*“ genetički pristup), započet 1993. i dovršen dvije godine kasnije, rezultirao je opisom oko 4000 letalnih fenotipova. Rezultat je objavljen 1996. godine, kao serija od 37 naučnih radova u istom izdanju časopisa *Development* (sveska 123, izdanje 1) i učvrstio je poziciju zebre kao model organizma za proučavanje genetike razvića. Rezultati sekvenciranja genoma zebre, objavljeni 2013. godine, pokazali su da približno 70% gena čovjeka ima svog očiglednog ortologa u genomu zebre (45). Popularnost zebre kao model organizma je u stalnom usponu, sudeći po broju publikacija u prethodne tri godine (3650, 4019 i 4378 po godini, u periodu 2018-2020, PubMed baza, termin za pretragu „zebrafish“).



Slika 2. Istorijski pregled važnijih događaja vezanih za istraživanja na zebreci kao model organizmu.

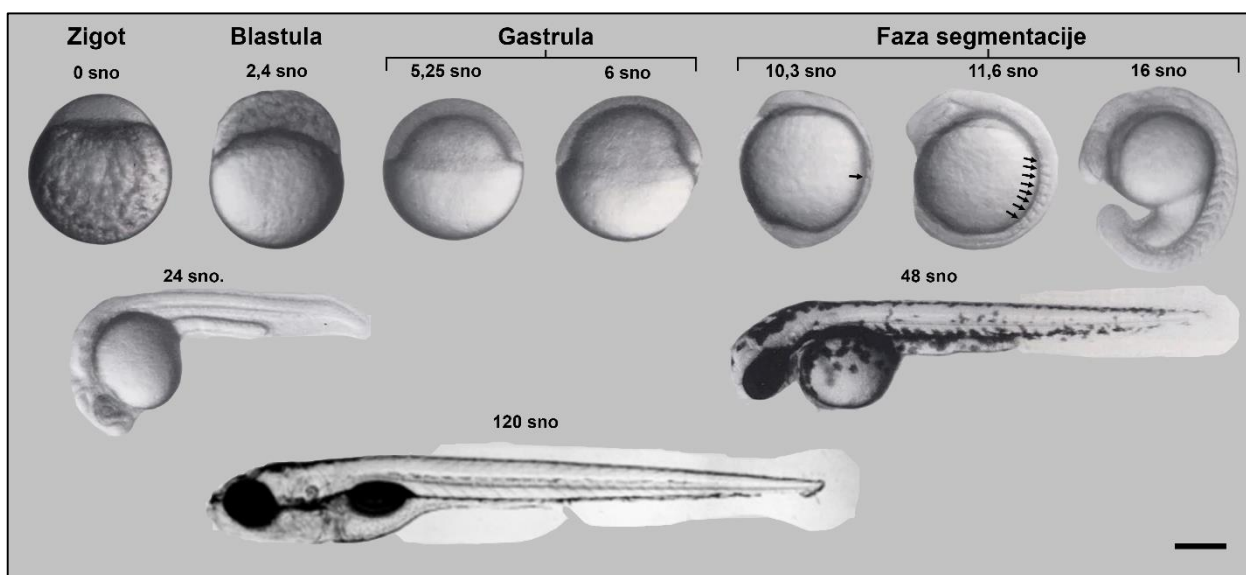
U laboratorijskim uslovima, zebreci se mogu relativno lako i ekonomično gajiti u većem broju. Ženke, nezavisno od godišnjeg doba, produkuju na stotine jaja u jednom mrijestu, što je naročito pogodno za genetičke i toksikološke studije. Spoljašnje oplodjenje i razviće omogućavaju istraživaču dodatnu kontrolu i mogućnost manipulacije ovim procesima. Zbog providnosti embriona lako se može pratiti formiranje gotovo svih tjelesnih struktura tokom embrionalnog razvića zebreci. Korišćenjem modernih tehnika mikroskopije i brojnih transgenih reporterskih linija, moguće je uživo pratiti biološke procese sa velikom rezolucijom (46). Specijalizovana baza podataka ZFIN, posvećena zebreci kao model organizmu dostupna je na www.zfin.org. Sekvenciran genom, razvijeni genetički alati i visok fekunditet čine zebrecu naročito pogodnim modelom za genetičke manipulacije. U narednim poglavljima opisana su dva često korišćena pristupa genetičkom inženjeringu zebreci: CRISPR/Cas9 mutageneza i Tol2-posredovana transgeneza.

Zbog navedenih karakteristika i prednosti koje nudi, zebreci je kao model organizam našla svoje mjesto i u biomedicinskim istraživanjima (47), toksikologiji (48) i proučavanju tumora (49). Relativno nova oblast istraživanja u kojoj se zebreci koristi kao model sistem je regenerativna biologija. Dio istraživanja u okviru ove teze posvećen je regeneraciji srca zebreci, pa je ovaj proces opisan u zasebnom poglavlju.

1.2.1. Razviće zebreci

Detaljan opis razvića zebreci, od zigota do 72 sata starosti, dali su Kimmel i saradnici (Slika 3) (50). U trenutku oplodjenja, zigot je veličine oko 0,7 mm. Do prve diobe protekne oko 40 minuta, a zatim se diobe dešavaju u razmacima od po 15 minuta. Faza blastulacije, koja traje između 2 sata 15 min i 5 sata 14 min od oplodjenja, završava se formiranom blastulom koju čini 128 ćelija. Nakon toga, nizom ćelijskih dioba i morfogenetičkih pomjeranja u fazi gastrulacije, izdvajaju se dva ćelijska sloja: epiblast i hipoblast. Od epiblasta će se formirati elementi ektoderma, kao što su epidermis i centralni nervi sistem. Derivati hipoblasta su tkiva koja se tokom embriogeneze diferenciraju od ćelija mezoderma i endoderma. Ova dva sloja nisu jasno morfološki izdiferencirana do pred sam kraj gastrulacije zebreci, iako je sudbina ćelija u njima već određena (51). Tokom perioda segmentacije (10-24 sata nakon oplodjenja (sno)), dolazi do formiranja somita, začeci organa su vidljivi, embrion se izdužuje i počinju spontane kontrakcije mišića (50). Embrion se izliježe iz horiona 48 sno, i u prvih

5 dana živi na račun žumanceta preostalog u žumančičnoj kesi. Nakon tog perioda počinje aktivno traženje hrane. U periodu od 72 sno do 30 dana od oplođenja, zebrice se označavaju kao larve. Reproductivnu zrelost jedinke dostižu nakon 3 do 4 mjeseca, zavisno od načina ishrane.



Slika 3. Stadijumi u razviću zebrice tokom prvih 5 dana života. Strjelice pokazuju somite. Razmjernik je 250 µm. Pojedinačne mikrofotografije preuzete iz publikacije Kimmel i saradnika (50). sno=sati nakon oplođenja.

1.2.2. Razviće skeletnih mišića zebrice

Segmentacija mezoderma na prepoznatljive somite počinje nakon 10 sno, a završava se nakon 24 sno, sa formiranih 30-34 somita. Prvo se formiraju anteriorni somiti, a zatim posteriorni. Na površini somita je epitel, dok je unutrašnjost ispunjena mezenhimalnim tkivom. Najveći udio unutrašnjih ćelija čine prekursori mišića (50). Prije segmentisanja mezoderma na somite, dvije populacije morfološki različitih ćelija su vidljive u segmentacijskoj ploči: adaksijalne ćelije i lateralne presomitske ćelije (Slika 4 A).

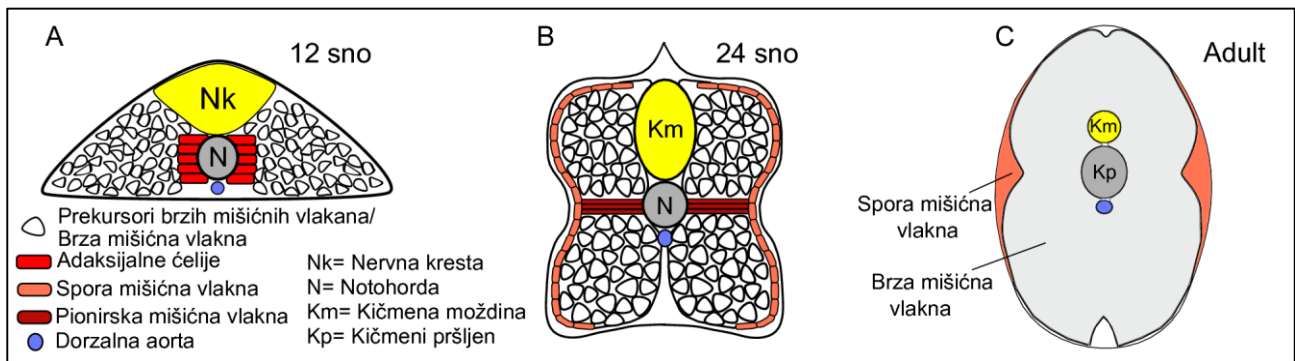
Adaksijalne ćelije se nalaze medijalno, uz samu notohordu. Ove krupnije, kockaste ćelije, koje eksprimiraju *myoD* (*protein miogene diferencijacije 1*) i *myf5* (*miogeni faktor 5*), se izdužuju nakon formiranja somita, tako da zauzimaju čitavu dužinu somita, a potom migriraju medio-lateralno ka spoljašnjosti embriona. Tu formiraju sloj površinskih mišićnih ćelija koje se diferenciraju u spora mišićna vlakna. Subpopulaciju adaksijalnih ćelija čine pionirske mišićne ćelije, koje ne migriraju na površinu embriona, već ostaju u lateralnom kontaktu sa notohordom, formirajući sloj ćelija u strukturi koja će postati horizontalni mioseptum koji odvaja epaksijalnu i hipaksijalnu mišićnu masu.

Brojnije i sitnije lateralne presomitske ćelije formiraju masu u unutrašnjosti somita. One će se diferencirati u brza mišićna vlakna. Za razliku od sporih vlakana, brza mišićna vlakna su multijedarna, uslijed fuzije pojedinačnih mišićnih ćelija (52). Na kraju procesa formiranja, miotom ima karakterističan oblik položenog slova V, sa brzim mišićnim vlaknima koja čine unutrašnji, najveći dio mišićne mase i jednoćelijskim slojem sporih vlakana na površini embriona (Slika 4 B). Nakon tri nedjelje života, sloj sporih mišićnih vlakana formira zadebljanje duž medio-lateralne ose (Slika 4 C). Ovakav raspored mišićnih ćelija ostaje tokom čitavog života zebrice (53).

Miogeneza je pod strogom genetičkom kontrolom u kojoj međućelijska signalizacija indukuje različite regulatorne mreže koje dalje usmjeravaju i održavaju fenotip mišićnih vlakana. Proces započinje usmjeravanjem diferencijacije mezodermalnih ćelija ka mišićnoj liniji, kroz ekspresiju

miogenih regulatornih faktora, poput MyoD i Myf5. Za usmjeravanje i održavanje ćelijskog identiteta adaksijalnih ćelija ka sporom mišićnom fenotipu ključna je *hedgehog* signalizacija, porijeklom iz notohorde. Sa druge strane, regulatorna mreža u brzim mišićnim vlaknima je najvećim dijelom pod uticajem signalizacije *faktora rasta fibroblasta* (eng. *fibroblast growth factor*, FGF) (54).

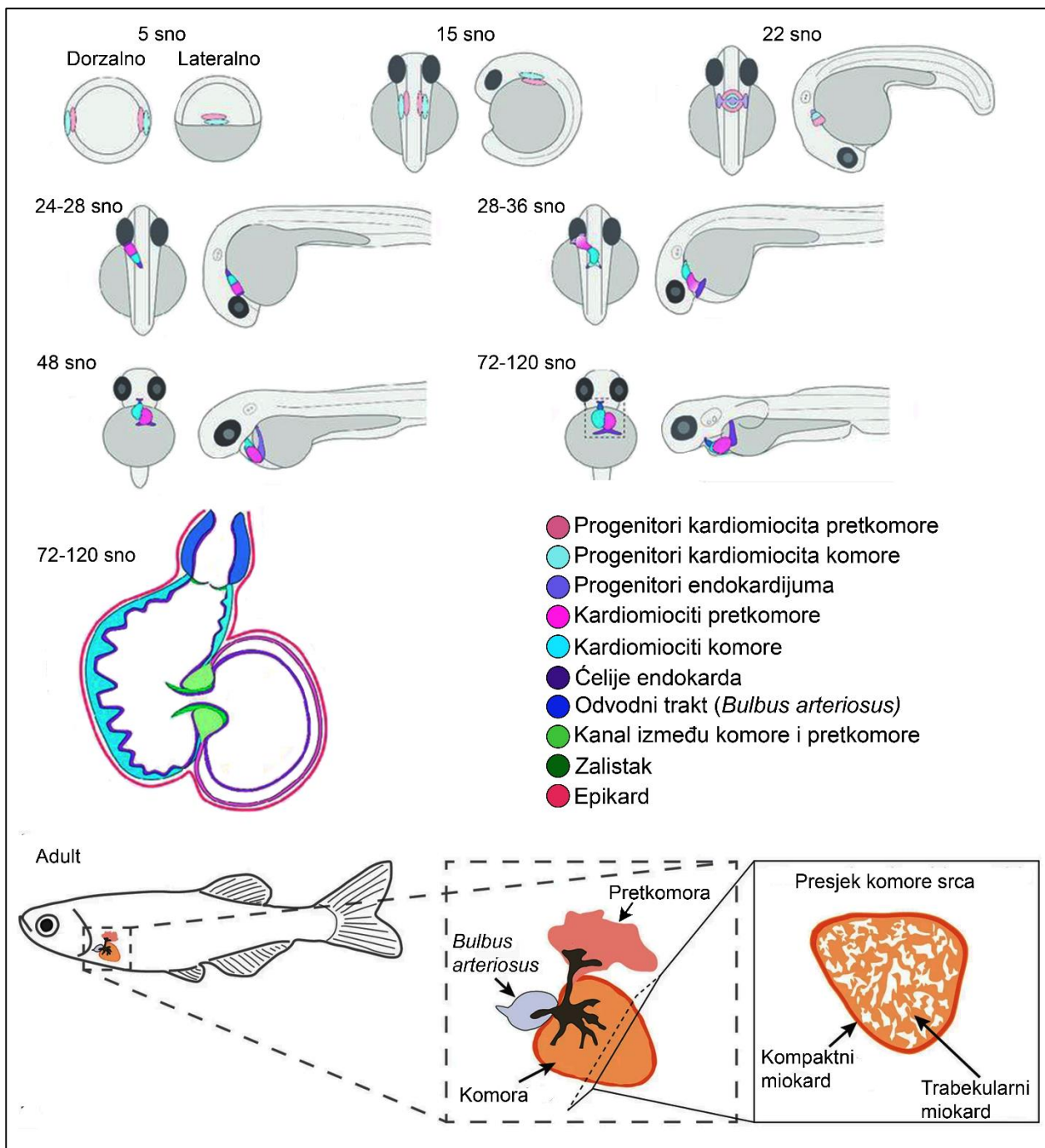
Svi popriječno-prugasti mišići glave derivati su paraksijalnog mezoderma. Njihovo razviće se odvija kroz diferencijaciju 7 zasebnih segmenata, faringealnih lukova, u koordinaciji sa razvićem hrskavice. Formirane mape ćelijskih sudbina sugerišu da su njihovi ćelijski prekursori organizovani u zasebne kompartmane embriona rano u razviću (55). Genetička kontrola identiteta pojedinačnih mišića nije u potpunosti rasvijetljena, ali je evidentna na primjeru proteina *Engrail* koji definiše mandibularnu mišićnu ploču iz koje se diferenciraju dva zasebna mišića (56). Organizacija mišića glave podliježe promjenama tokom razvića zebrice, u skladu sa formiranjem novih elemenata hrskavice prisutnih samo kod adultnih jedinki. Za razliku od jednoličnog rasporeda brzih i sporih mišićnih vlakana duž uzdužne ose trupa i repa zebrice, raspored i zastupljenost ovih tipova vlakana se razlikuje među mišićima glave. Ipak, i kod mišića glave mješovitog sastava, spora i brza vlakna zauzimaju diskretne teritorije (57).



Slika 4. Šematski prikaz pozicija prekursora mišićnih ćelija prije formiranja somita (A), diferenciranih mišićnih ćelija nakon formiranja somita (B) i pozicije sporih i brzih mišićnih ćelija u miotomu adulta (C). sno= sati nakon oplodjenja.

1.2.3. Razviće srca zebrice

Srce zebrice formira se od bilateralno pozicioniranih progenitorskih ćelija mezoderma lateralne ploče (Slika 5). Ove ćelije migriraju medijalno formirajući intermedijarni srčani disk, koji zatvaranjem formira primitivnu srčanu tubu i migrira na lijevu stranu tijela (Slika 5). Na stadijumu 24 sno srce započinje ritmične kontrakcije. Od 24 do 48 sno, srce prolazi kroz niz morfoloških izmjena, izdužuje se, migrira ka sredini, uvrće, postavljajući buduću komoru na desno i konačno dobija oblik slova „S“ (Slika 5) (58,59).



Slika 5. Šematski prikaz faza razvića srca zebrice od stadijuma gastrule, 5 sno do 120 sno. Pozicija i građa srca adulta prikazana je na dnu slike. Djelovi slike preuzeti iz publikacija Brown i saradnici (60) i Bise i saradnici (61) i modificovani. sno=sati nakon oplodjenja.

Nakon 2 dana razvića, uočljiva su 4 segmenta srca odvojena konstrikcijama zida: venozni sinus (*sinus venosus*), pretkomora, komora i odvodni trakt (*bulbus arteriosus*) (Slika 5). Srce se nalazi zatvoreno u perikardijalnoj šupljini i izgrađeno je od tri sloja: endokardijuma, mišićnog miokardijuma i epikardijuma (58). Nakon 5 dana razvića, u komori su vidljive formirane trabekule, izduženi zidovi sačinjeni od kardiomiocita odvojenih od zida miokardijuma delaminacijom i koji u najvećoj mjeri doprinose sili kontrakcija. U isto vrijeme, unutrašnja površina pretkomora je još uvijek glatka, ali će se u narednim danima razviti pektinatni mišić. Komora i pretkomora su odvojene trolisnim srčanim zalistkom. Odvodni trakt sličnih je karakteristika kao i komora, pozitivno se boji antitijelom na

miozin (MF-20). Srce adultne jedinke 3 mjeseca nakon oplodjenja postiže svoj konačan oblik. Konstrikcije između segmenata su izraženije, komora i pretkomora dobijaju svoj karakterističan oblik, a odvodni trakt se sastoji od glatkih mišićnih ćelija, kolagena i elastina. U miokardu komore razlikujemo zadebljali spoljni kortikalni sloj ćelija koji okružuje gust sistem trabekula koje se pružaju ka lumenu komore. U pretkomori je vidljiv granat pektinatni mišić (62).

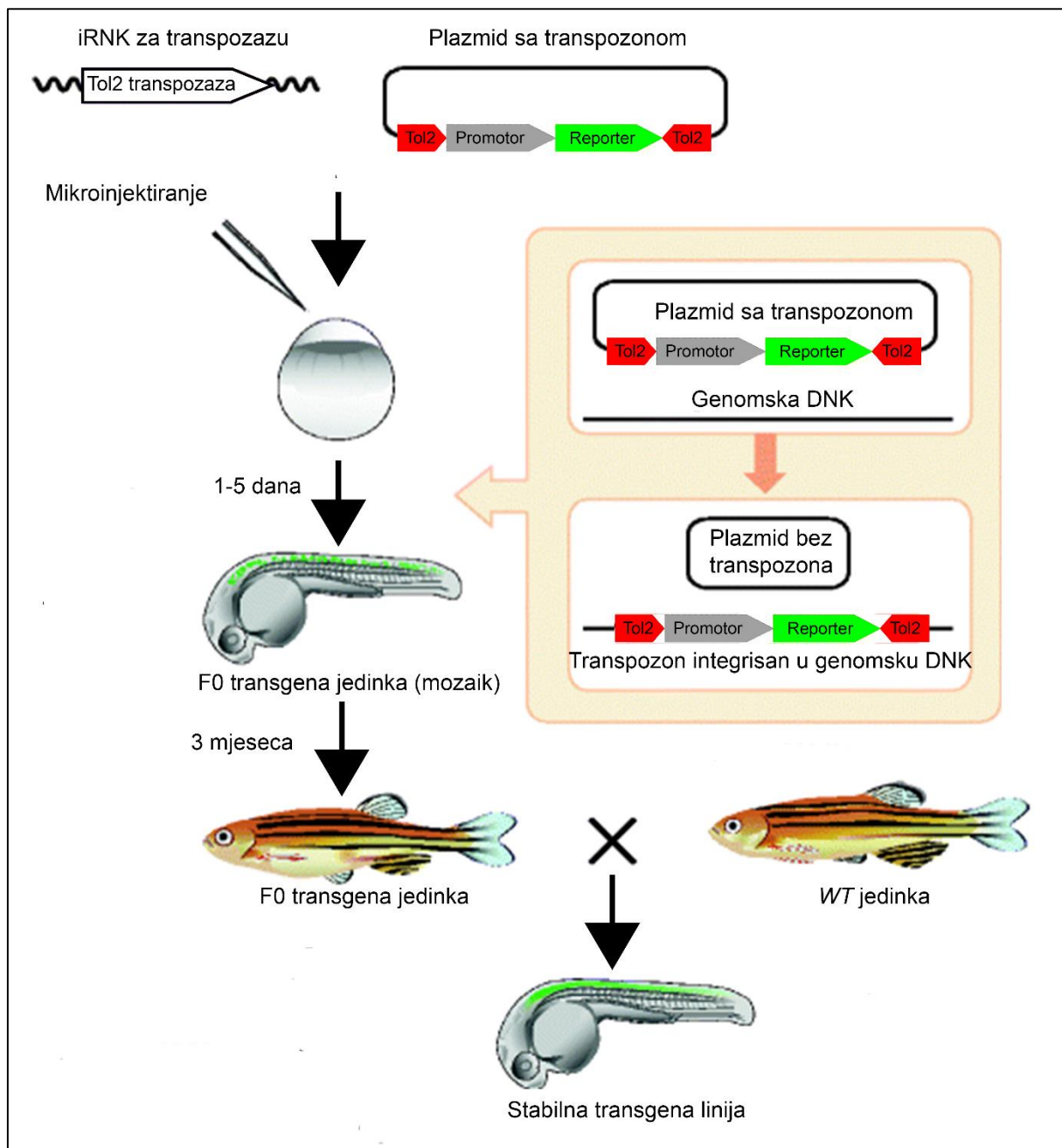
1.2.4. Alati za genetičke manipulacije u zebrici

Zebrice su pogodan model sistem jer se na njima relativno jednostavno mogu vršiti različite genetičke manipulacije. Neke od prednosti ovog modela su: visok broj jedinki u potomstvu, krupne jajne ćelije u koje je lako injektirati supstance, spoljašnje razviće i relativno brzo dostizanje polne zrelosti. Do danas je razvijen širok spektar metodoloških pristupa u genetičkim studijama na zebricama: od obimnih skrininga nasusmične mutageneze do preciznog uvođenja željenih mutacija i ekspresionih konstrukata (63). U ovom poglavlju će biti detaljnije opisani genetički alati koji su primjenjeni u okviru ove teze: Tol2-posredovana transgeneza za generisanje transgenih linija i CRISPR/Cas9 tehnologija za uvođenje mutacija u genom.

1.2.4.1. Transgene linije zebrice

Transgeneza, prolazno uvođenje vještačkih DNK konstrukata u ćelije ili njihova trajna integracija u genom organizma primaoca, jedna je od osnovnih metodologija u proučavanju genetičkih modela. Ovaj pristup se već duži niz godina koristi za identifikaciju regulatornih elemenata DNK (64–66), modelovanje bolesti čovjeka (67,68) i obilježavanje specifičnih ćelijskih populacija proteinskim fluoroforima radi njihovog *in vivo* posmatranja ili izolacije (69,70). Transgene linije model organizama stabilno prenose eksperimentalno integrisani fragment DNK u sledeću generaciju. Raširena upotreba transgenih linija kod zebrice posljedica je prednosti koje one donose i potrebe da se prevaziđu tehnička ograničenja ovog modela. Transgene linije zebrice se relativno lako generišu, a providnost embriona i larvi omogućava *in vivo* detekciju fluorescentnih markera. Osim toga, transgenim linijama se često nadomješćuje nedostatak antitijela specifičnih za proteine zebrice. U okviru transgena, uzvodno od reportera kloniraju se kraći ili duži segmenti molekula DNK, kao što su promotori i regulatorni elementi (vezujuća mjesta za regulatorne proteine transkripcije), koji će odrediti ekspresioni profil transgena (71). U slučajevima kada sve potrebne regulatorne sekvence nije moguće precizno identifikovati ili su one međusobno udaljene, alternativni pristup je korišćenje bakterijskih vještačkih hromozoma (eng. *Bacterial artificial chromosome*, BAC) kao vektora (72). BAC konstrukti obuhvataju region DNK veličine 60-300 kb, omogućavajući prenošenje većine, ako ne i svih, *cis* regulatornih elemenata u njihovom prirodnom genomskom kontekstu (72). Obuhvatanje svih regulatornih elemenata ispitivanog gena u okviru transgena, pod čijom kontrolom će se eksprimirati određeni reporter, je ključno za pravilnu vremensko-prostornu rekapitulaciju ekspresije nakon transgeneze (73).

Stuart i saradnici generisali su prve transgene linije zebrice injektiranjem linearizovanih i cirkularnih DNK konstrukata u oplodjene jajne ćelije (74,75). Ovakvim pristupom, samo 1-10% injektiranih zebrica je prenosilo integrisani konstrukt u narednu generaciju. Veća efikasnost transgeneze postignuta je primjenom meganukleaze I-Sce i plazmidnog konstrukta koji sadrži odgovarajuća vezujuća mjesta za nukleazu (76,77). Dalje unaprijeđenje metodologije došlo je sa razvojem tehnologija transgeneze baziranih na transpozonima. Među njima, najveću popularnost u primjeni na zebricama ima Tol2-posredovana transgeneza, bazirana na Tol2 transpozabilnom elementu sličnom članovima hAT familije transpozona, identifikovanog u ribi medaka (*Oryzias latipes*) (Slika 6) (78).



Slika 6. Princip Tol2-posredovane transgeneze kod zebrice. Sintetisana iRNA za Tol2 transpozazu i plazmidni konstrukt koji sadrži invertovane terminalne ponovke Tol2 transpozona se koinjektiraju u oplodenu jajnu ćeliju. Jedinke F0 generacije ekspimiraju transgen mozaično i srazmjerno efikasnosti integracije transpozona neposredno nakon injektiranja. Ukoliko se transpozon integrisao u genom ćelija germinativne linije, potomstvo iz ukrštanja F0 i jedinki *WT* u svim ćelijama nosi integraciju i predstavlja začetnike stabilne transgene linije. Slika preuzeta iz publikacije Suster i saradnika (79) i modifikovana. *WT*=divlji soj.

Element Tol2 je autonomni transpozon koji kodira transpozazu sposobnu da isjeća transpozabilni element sa plazmidnog konstrukta i integriše ga u genom nakon eksperimentalnog unošenja u ćelije zebrice i drugih kičmenjaka (80–82). Efikasnost Tol2 transgeneze kod zebrica je oko 50%, što predstavlja značajno unaprijeđenje u odnosu na ranije metode (83). Vremenom je metodologija Tol2 transgeneze unaprijeđena modifikacijama terminalnih ponovaka Tol2 elementa neophodnih za

transpoziciju i razvojem velikog broja plazmidnih konstrukata koji omogućavaju jednostavno i brzo generisanje željenih transgenih linija (84–86).

Osim visoke efikasnosti, vektori bazirani na Tol2 elementu imaju i veliku prednost u pogledu kapaciteta (84). Ovo svojstvo je naročito korisno kod transgeneze sa BAC konstruktima. Transgenezom sa modifikovanim BAC konstruktima koji nose invertovane terminalne ponovke Tol2 elementa postiže se ugradnja u genom primaoca cjelovitih pojedinačnih kopija konstrukta (87). Na ovaj način se izbjegavaju dva problema koja se javljaju pri injektiranju BAC konstrukata bez Tol2 elemenata: niska efikasnost transgeneze i ugradnja konstrukta u vidu konkatamera koja može dovesti do utišavanja ekspresije transgena (88). Informacije o velikom broju do danas generisanih transgenih linija zebrice dostupne su u bazi *ZFIN* (89).

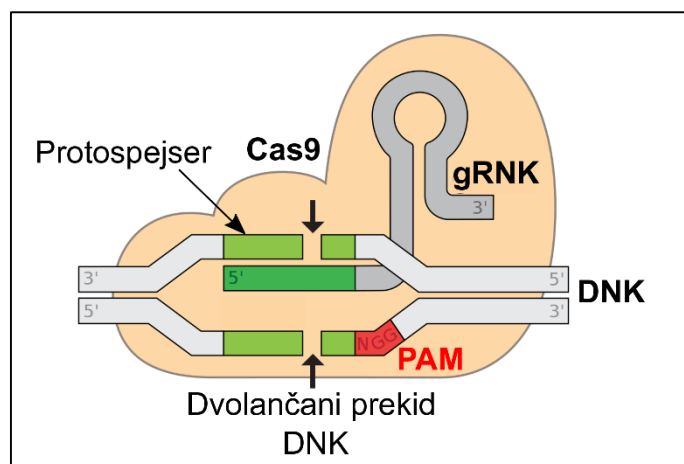
1.2.4.2. CRISPR/Cas9 mutageneza

Jedan od pristupa funkcionalnoj analizi proteina je njihovo eliminisanje iz proučavanog modela, kroz precizno uvođenje promjena u kodirajućoj sekvenci. U okviru ove teze, za uvođenje mutacija u genima korišćena je tehnologija CRISPR/Cas9 mutageneze.

Grupisani (klasterovani) pravilno razmaknuti kratki palindromski ponovci (eng. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR) i asocirane nukleaze (Cas) predstavljaju formu adaptivnog imuniteta eubakterija i arhea (90). Sistem se zasniva na ugradnji egzogene DNK u region genoma bakterije, označen kao spejser, oivičen kratkim palindromskim ponovcima. Više ovakvih spejser-ponovak struktura formira niz koji se transkribuje u jedan molekul RNK, čijim isjecanjem nastaje niz pojedinačnih CRISPR-RNK (crRNK). Molekuli crRNK formiraju komplekse sa Cas nukleazama i usmjeravaju njihovu katalitičku aktivnost na one sekvence sa kojima se komplementarno sparuju (90). CRISPR/Cas sistemi su podijeljeni na 3 klase prema konzerviranosti *cas* gena i opštoj organizaciji CRISPR lokusa (91).

CRISPR sistem klase II, iz bakterije *Streptococcus pyogenes*, našao je široku primjenu u genetičkom inženjerstvu. Ovaj sistem uključuje Cas9 nukleazu i dva manja molekula RNK: crRNK i transaktivirajuću crRNK (tracrRNK) (92). crRNK obezbjeđuje specifičnost za sekvencu, dok je tracrRNK neophodna za obradu pre-crRNK i nukleaznu aktivnost RNK-Cas9 kompleksa. Sve navedene funkcije može vršiti himerni RNK molekul, nazvan vodič RNK (skraćeno gRNK od eng. *guide RNA*), dobijen fuzionisanjem crRNK i tracrRNK (Slika 7) (93). Sistem zahtjeva, pored bazne komplementarnosti između gRNK i ciljne genomske DNK sekvence, prisustvo motiva koji se nalazi uz protospejser (PAM, eng. *protospacer adjacent motif*) na 3' kraju ciljne genomske sekvence. U slučaju Cas9 nukleaze iz *S. pyogenes*, motiv PAM je sekvenca 5'-NGG-3', gdje je N bilo koji nukleotid (93,94). Nakon formiranja kompleksa sa ciljnom genomskom sekvencom, nukleaza Cas9 uvodi dvolančane prekide u genomskoj DNK. Samo uvođenje promjena u primarnu strukturu DNK rezultat je ćelijskog mehanizma reparacije dvolančanih prekida molekula DNK. Prekidi DNK se mogu popraviti nehomolognim spajanjem krajeva (eng. *non-homologous end joining*, *NHEJ*) koje uvodi nasumične greške pri reparaciji, ili pomoću homologne matrice na osnovu koje se DNK reparira (eng. *homology-directed repair*, *HDR*) (95).

CRISPR/Cas9 sistem je uspješno primjenjen na različitim eksperimentalnim modelima: *in vitro* (93), sisarskim ćelijskim linijama (95–98), kvascu (99), mišu (100) i zebrici (101–103). Od otkrića i početka primjene kao alata za genetičko inženjerstvo, CRISPR/Cas sistem se dalje razvija u pravcu šire mogućnosti primjene i veće fleksibilnosti pri odabiru ciljnih sekvenci (104).



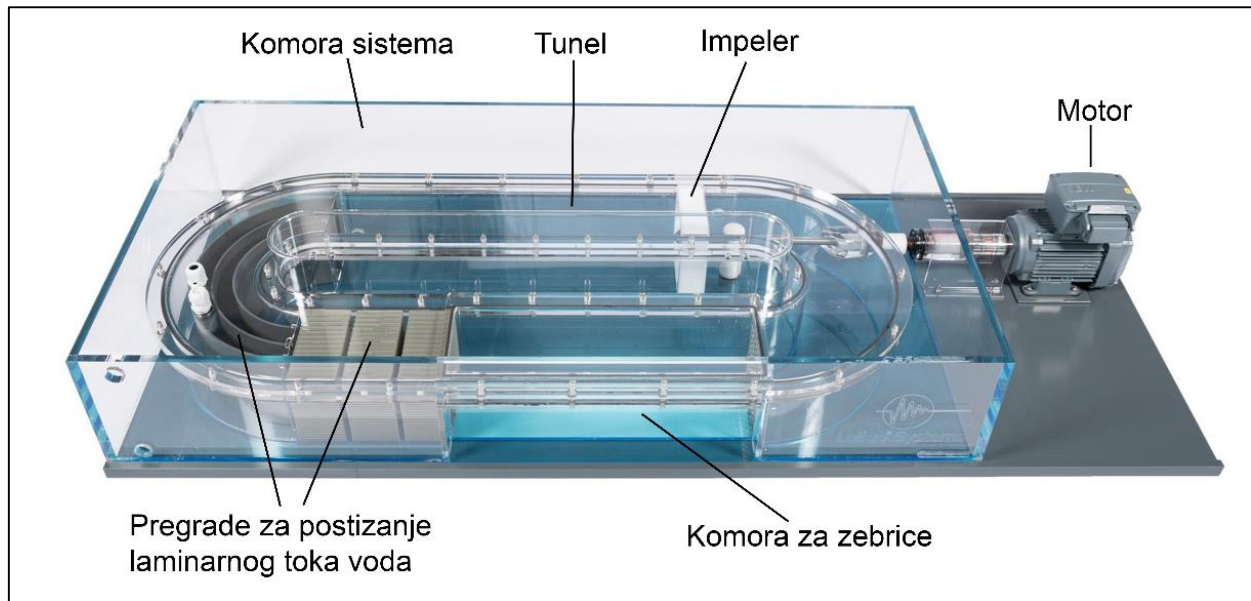
Slika 7. Vezivanje kompleksa gRNK i Cas9 za protospeser sekvencu u genomskoj DNK i uvođenje dvolančanog prekida. gRNK=vodič RNK, PAM=motiv uz protospeser (eng. *Protospacer adjacent motif*). Preuzeto sa <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:GRNA-Cas9.svg> (autor Marius Walter) i modificirano.

1.2.5. Trening i modelovanje povećane fizičke aktivnosti zebriće

Zbog svoje uloge u kretanju i održavanju metaboličke homeostaze organizma, mišići su često izloženi „izazovima“ iz spoljašnje i unutrašnje sredine poput povećane fizičke aktivnosti i izmjenjenog nutritivnog statusa jedinke. Zahvaljujući visokoj fenotipskoj plastičnosti, mišići su u stanju da se prilagode novim uslovima kroz remodelovanje kontraktilnog aparata (105,106) i metaboličku adaptaciju (107). Sa zdravstvenog aspekta je posebno interesantno prilagođavanje mišića na kontinuiranu povećanu fizičku aktivnost koja se postiže treningom. U odgovoru na trening, u skeletnim mišićima i srčanom mišiću sisara dolazi do niza adaptivnih promjena u metabolizmu i hipertrofije (108,109).

U posljednjih desetak godina, zebrića se učestalije koristi kao model organizam za proučavanje procesa u mišićima iniciranih treningom. Osim već navedenih pogodnosti kada su u pitanju genetički alati i dostupnost transgenih linija, specifičan prostorni raspored brzih i sporih mišićnih vlakana predstavlja još jednu prednost ovog modela. Za razliku od skeletnih mišića sisara kod kojih su različiti tipovi vlakana izmiješani, kod zebriće postoji prostorna odvojenost brzih i sporih mišića. Brzi i spori mišići riba imaju odvojene uloge u kretanju i različite mehanizme adaptacije na stres (110,111). Od velike važnosti za zebriću kao model organizam je to što dosadašnja istraživanja ukazuju da je, kao i kod sisara, rast skeletnih mišića i srca zebriće determinisan, odnosno da ovi organi ne rastu tokom čitavog života već dostižu svoju konačnu, genetski određenu formu na stadijumu zrelog adulta (112,113).

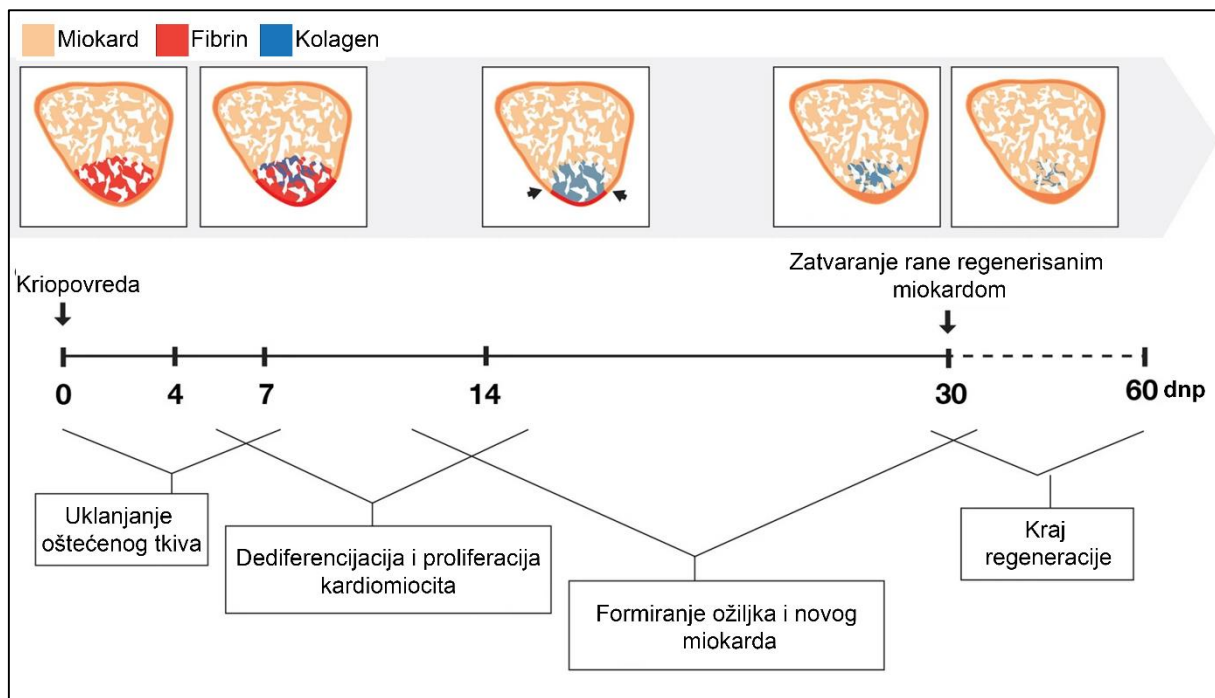
Modelovanje treninga kod riba izvodi se u posebno konstruisanim tunelima u kojima životinje plivaju nasuprot toku (Slika 8). Brzina protoka se reguliše podešavanjem brzine rada pumpe ili imelera koji pokreće vodu. U tunelima sa zatvorenom cirkulacijom, moguće je mjeriti i promjene koncentracije kiseonika u vodi, kao pokazatelja energetske potrošnje. Upravo u jednom ovakvom sistemu su Palstra i saradnici utvrdili optimalnu brzinu plivanja zebriće, koja iznosi oko 0,4 m/s, odnosno oko 13 dužina tijela zebriće u sekundi.



Slika 8. Primjer aparature za treniranje zebrica (model „360° swim tunnel“, Loligo systems, Danska).

1.2.6. Regeneracija srca zebrice

Povreda srca sisara, poput onog izazvanog infarktom miokarda, vodi ka trajnom gubitku oštećenih kardiomiocita koji bivaju zamijenjeni nekontraktilnim ožiljačnim tkivom. Proliferacija preostalih kardiomiocita, iako povećana, nije dovoljna da nadomjesti gubitak, te dolazi do slabljenja srčane funkcije koja dovodi do kompenzatorne hipertrofije srčanog mišića i progresivnog slabljenja kontraktilnosti (114,115). Za razliku od sisara, mnoge vrste repatih vodozemaca i riba, među njima i zebrica, posjeduju značajan regenerativni kapacitet organa i u stanju su da u potpunosti regenerišu srce nakon povrede (116,117). Regeneracija srca zebrice se odvija kroz koordinisane procese u epikardu, miokardu i endokardu koji konačno restituišu funkcionalno tkivo sa svim tipovima ćelija tipično prisutnim u zdravom srcu (118–120). Iako je bilo očekivano postojanje populacije matičnih ćelija koje će nadomjestiti gubitak, kao najveći izvor novih kardiomiocita identifikovani su već postojeći kardiomiociti, preostali nakon povrede, koji se dediferenciraju i ulaze u ćelijski ciklus (119). Kod zebrica su okarakterisana tri modela povrede srca: resekcija dijela komore, genetička ablacija i kriopovreda komore (117,121,122). Među ovim modelima, kriopovreda komore praćena inflamacijom i masovnom apoptozom ćelija zahvaćenih povredom, najviše odgovara procesima kod infarkta miokarda sisara (Slika 9) (122). Tokom regeneracije komore odvija se nekoliko međusobno preklapljenih procesa: inflamatorni odgovor i uklanjanje mrtvih ćelija, formiranje sloja fibrina koji zatvara ranu i produkcija kolagena od strane fibroblasta, formiranje novog miokarda sa paralelnim uklanjanjem ekstraćelijskog matriksa sačinjenog od fibrina i kolagena. Do potpune regeneracije nakon povrede koja zahvata oko 20% komore dolazi u roku od 60 dana (122).



Slika 9. Šematski prikaz toka regeneracije srca zebrice po danima od kriopovrede. Slika preuzeta iz publikacije Bise i saradnika (61) i modifikovana. dnp=dana nakon povrede.

2. Ciljevi

Imajući u vidu nedovoljno poznatu funkciju proteina familije MARP, u ovoj studiji je korišćena zebrica kao model organizam za dalje proučavanje njihove funkcije. Zebrica uspješno nadomještuje nedostatke sisarskih eksperimentalnih modela, nudeći brojne metodološke prednosti, naročito u izučavanju biologije razvića, dok se genetičke manipulacije izvode relativno lako. Stoga je cilj ove studije bio da se okarakterišu geni *MARP* zebrice u razviću i odgovoru na stres. Za modelovanje mišićnog stresa odabrani su povećana mišićna aktivnost i povreda srca, stanja u kojima dolazi do promjene ekspresije gena *MARP* sisara.

U skladu sa tim, definisani su sljedeći ciljevi:

- procjena evolucione očuvanosti članova familije MARP zebrice analizom filogenetskih odnosa i poređenjem strukture njihovih gena i proteina sa sisarskim ortolozima;
- utvrđivanje razvojnog i tkivnog profila ekspresije gena *MARP* zebrice tokom razvića i na stadijumu adulta;
- analiza ekspresije gena *MARP* zebrice u odgovoru skeletnih mišića i srca na stres izazvan povećanom fizičkom aktivnošću;
- analiza ekspresije gena *MARP* zebrice u srcu tokom regeneracije nakon kriopovrede srčane komore, kao modela infarkta miokarda;
- generisanje mutanata za gene *MARP* zebrice primjenom tehnologije CRISPR/Cas9 i analiza fenotipa;
- utvrđivanje potencijalne uloge članova familije MARP u:
 - razviću zebrice;
 - regeneraciji srca zebrice nakon kriopovrede.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Graničnici

Nukleotidne sekvence (u orijentaciji 5'-3') i drugi podaci o graničnicima korišćenim u ovom radu su navedeni tabelarno (Tabele 1-5), prema nameni.

Tabela 1. Podaci o graničnicima korišćenim za sintezu konstrukta *BAC(ankrd1a:EGFP)*

Broj	Sekvenca	Namjena
1	TTCTCTGTTTTGTCCGTGGAATGAACAATGGAA GTCCGAGCTCATCGCTCCCTGCTCGAGCCGGGCC CAAGTG	Umnožavanje iTol2_amp kasete sa homologim krajevima specifičnim za pIndigoBAC536
2	AGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGA ACCCCTTGCGGCCGCATATTATGATCCTCTAGAT CAGATC	
3	TATAGCAAAACACACACAGACCGAGAGCTGAAG ACAAACTCCTGATCATAGCCATGGTGAGCAAGG GCGAGGAG	Umnožavanje EGFP_kan kasete sa homologim krajevima specifičnim za <i>ankrd1a</i> lokus
4	GCTGCAAGCATCAGCACAAACTTACCAGCTCT TCAACACGCAGCAGCCCTTCCAGAAGTAGTGAG GAG	
5	GTTTAAGGCGTTTCCGTTC	Potvrda pravilne rekombinacije iTol2_amp kasete na homologoj ručici 1
6	ACATTTCCCCGAAAAGTGG	
7	CTGAGATAGGTGCCTCACTG	Potvrda pravilne rekombinacije iTol2_amp kasete na homologoj ručici 2
8	TGGTGCACTCTCAGTACAATC	
9	CGGAGGCTCAGGAAAGATGA	Potvrda pravilne rekombinacije EGFP_kan kasete na homologoj ručici 1
10	GTCTTGTAGTTGCCGTCGTC	
11	TCCTCGTGCTTTACGGTATC	Potvrda pravilne rekombinacije EGFP_kan kasete na homologoj ručici 2
12	AGTTTGCAACCACTTCCATAAAA	

Tabela 2. Podaci o graničnicima korišćenim za genotipizaciju *MARP* mutanata analizom krive topljenja visoke rezolucije (HRMA, eng. *High resolution melting analysis*).

Gen	Graničnik F	Graničnik R
<i>ankrd1a</i>	GACCAGGGGTTGTTTCTCAA	CACTCACATGATCACAGGCA
<i>ankrd1b</i>	TCATTACCCCGCAGAATGAT	ATCACATGCATTTGGGTCTG
<i>ankrd2</i>	TTAAAAGCAGCAGCTCAGGG	AATTTCTGACATGATGCACCTC

Tabela 3. Graničnici korišćeni za umnožavanje fragmenata DNK koji su sekvencirani u cilju provjere uvedenih mutacija u *MARP* gene.

Gen	Graničnik F	Graničnik R
<i>ankrd1a</i>	AAGCAGGATGGCATTACACAC	TCAGGCCAACACCCTTACA
<i>ankrd1b</i>	AGAGCTCTGCTGACCATCA	AGCTTCCAGAAGTGCGTTC
<i>ankrd2</i>	TTGATCTAGGAGGCGCAGA	TACAGCACCTTAGCATTGG

Tabela 4. Graničnici korišćeni za kvantifikaciju transkripata metodom RT-qPCR.

Transkript	Graničnik F	Graničnik R
<i>ankrd1a</i>	CAGAGCCTGATATCTTGCCTGAAAC	CATGATCTCTGTGTGACCTTGTGC
<i>ankrd1b</i>	CATCACAGGTGGAAACACAGA	CCGCTGAGAATGACTTCACC
<i>ankrd2</i>	AGGGCATTACAGCCACTGAA	GTGCATCCCCAAGTGTTTGT
<i>rpl13a</i>	TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG
<i>tnni2b.2</i>	AGGTGGACAGAGTTAATTACATGG	TCAGATCCTCAATCTCTTTGTAC
<i>tmod4</i>	CGCAACAGATGCTGAAATGTG	TTTACCACACTGTTGATGCC
<i>casq1a</i>	CTTCTTCAAGAGCAACAAATCC	GTTAATATCGTCTTCCCAGATCTC
<i>casq1b</i>	ATAACACAGAGAATCCTGACCT	CCAGATACTCTCAGCATCATCC
<i>tgfb2l</i>	CAGACACCTCCATATGCACAC	CACAGGTAAGGACAGTTCCC
<i>mstnb</i>	CATGGCCACAGAACCTGACC	CCGGTCTCAGATGAACCCAG
<i>col8a2</i>	AGGGTGAGTTTGTAACTTTGTGAC	CGTACTTCATCTGAGGCATAGG
<i>lamc3</i>	CTAAAGATGCCAAAGCCTCCT	GAAGAAACCATGTCCTCCTCTG
<i>cpt1b</i>	GCATTCAGTTCACCGTCAC	AACACTGTTCTTAAAGCGGATGG
<i>pfkma</i>	TCATGTCAGCAAAGGTAAGATCAC	AGTCTGTGCCAATAGTCATGTC
<i>pdk2b</i>	GAATGAGCAACAGTTTGAAGGAG	AGAGTTTCCACAAATTCTGCGA
<i>fbxo32</i>	CATTCAATCGCTTGGACTTCTG	TTGCTGATCATCGAGAACTTTCTG
<i>dcn</i>	AAATTCCACTTGATACCACTCTCC	CCAAGATGAGCGTTTGGAGAC
<i>aplnrb</i>	CATATTCTCTGATTCCCCTGCT	GAGCCAGGTTTCCAATGTAGAC
<i>aplnra</i>	TAATGACTCTGGGTGTGACTACTC	GTTGCCGATATAAACATCTGCC
<i>cs</i>	AGACCTCGTCCCTAAAGAACAG	CTCATTCCCTCCATAAACCATGTCC
<i>ppargc1a</i>	ACCCAGGTATGACAGCTATGAG	CTCGCCTCTCCTCTATTGCT
<i>igf1</i>	TTATTTTCAGCAAACCGACAGGA	GTTGTGCTCGTAGAGATCGT
<i>il6r</i>	AGTGGATTTATAATGTGGACCCGA	CAGAAGGAGGATCTTGTGCGAG
<i>excl12b</i>	TTCCAAGTCATTGCCAAGCTG	CTTTAGAGATTCTCCGCTGTCC
<i>igfbp2a</i>	CTAAACAGAGCCAGTGCCAG	CCACGATAGCCATTCACTGAC
<i>casq2</i>	AACTTCCCATTGCTCATTCC	CTCGTCATCATTGGGTATCTC
<i>sparc</i>	GAACTACAACATGTACATCTTCCC	CGACATCCTGCTCTTTGATCC
<i>gys1</i>	AGAGTCAAAGTGATCTTCCATCC	AAACAGCCAAACCCAGACAG
<i>ctrb1</i>	GATACAATGCTCCCGATACTC	ACACGATACCAACCAAAGTC
<i>coll1a1a</i>	GCTTCCAGTTCGAGTATGGC	GTGACACTGTATGTGAAGCGG
<i>gpib</i>	CGCTTCTACCAGCTCATCC	CAACAGAATCTTGTGGTGAAGG
<i>lpl</i>	TCCATTATCAAGTGAAGGTCCA	GTTCAAAGTAGGCATAATGTAGGG
<i>nppa</i>	CCAAGCTCAAGAGCTTGCTG	CTGCTTCCTCTCGGTCTCTG
<i>pkmb</i>	CACACTCGGACCTGCTTCAC	ACGGACACTCTTGATGGTTTCAG
<i>aldocb</i>	GAACCGCCGTCTTTACCGTC	ACACCTTTGTCAACCTTGATTCTC
<i>ldha</i>	TGTTGGAATGGTAGGAATGGCTG	GCGGTCACACTGTAATCTTTATCC

Tabela 5. Sekvence graničnika za umnožavanje matrice za sintezu digoksinom (DIGom)-obilježenih RNK proba korišćenih za *in situ* RNK hibridizaciju. U posljednjoj koloni data je dužina amplikona.

Transkript	Graničnik F	Graničnik R	Dužina amplikona (bp)
<i>ankrd1a</i>	AGATAAGCTGGATGCCACAG	AAAAAGGAAAGAACATCTG AAACC	457
<i>ankrd1b</i>	CTTCAAGCAACTGAAGTCCA	AATATGCAGGCTCATAATAT CTCA	466
<i>ankrd2</i>	AGGCGTGAGATTGTTGATCTAGG	CTTTAGTGTCAAACCTGCCAC TGCT	664
<i>myod1</i>	CATTAACCCTCACTAAAGGGAAT TCTACGACGACCCTTGCTT	TAATACGACTCACTATAGGG TTCCAGCAGTGGATCAAAA	902

bp=baznih parova

3.1.2. Antitijela

Pregled antitijela korišćenih u radu dat je u Tabeli 6.

Tabela 6. Primarna i sekundarna antitijela.

Naziv	Antigen	Porijeklo i tip	Razblaženje	Proizvođač/izvor
Primarna antitijela				
anti-DIG-AP antitijelo na digoksinom konjugovano sa alkalnom fosfatazom	DIG	ovca, poliklonsko	1:5000	Roche, Švajcarska
F310	laki lanac miozina	miš, monoklonsko	1:10	DSHB, SAD
MF20	teški lanac miozina miša	zec, poliklonsko	1:100	ustupila G. Faulkner, Univerzitet u Padovi
anti-GFP	zeleni fluorescentni protein	zec, poliklonsko	1:500	ustupio M. Dinić, IMGGI, Univerzitet u Beogradu
anti-PCNA	jedarni antigen proliferišućih ćelija	miš, monoklonsko	1:500	Dako, SAD
anti-Mef-2 (C21)	Mef2 (eng. <i>myocyte enhancer factor-2</i>)	zec, monoklonsko	1:200	Santa Cruz, SAD
Sekundarna antitijela				
Anti mouse IgG Alexa Fluor 488	sekundarno antitijelo na imunoglobuline miša konjugovano sa fluoroforom Alexa Fluor 488	koza, poliklonsko	1:500	Thermo Fisher Scientific, SAD
Anti rabbit IgG Alexa Fluor 594	sekundarno antitijelo na imunoglobuline zeca konjugovano sa fluoroforom Alexa Fluor 594	koza, poliklonsko	1:500	Thermo Fisher Scientific, SAD

DIG=digoksinom, AP=alkalna fosfataza, DSHB=Developmental Studies Hybridoma Bank.

3.1.3. Rastvori i puferi

Pregled sastava korišćenih rastvora i pufera, prema namjeni dat je u Tabeli 7.

Tabela 7. Sastav rastvora i pufera korišćenih u ovom radu.

in situ RNK hibridizacija	
Hibridizacioni pufer	50% dejonizovani formamid
	5X SSC
	0,1% Tween 20
	50 µg/mL heparin
	500 µg/mL tRNK
	pH 6,0 podešen 1M limunskom kiselinom
2X SSC i 0,2X SSC	razblažen komercijalni pufer 20X SSC (<i>Invitrogen, SAD</i>)
Pufer za blokiranje	1X PBST
	2% serum ovce (<i>Sigma-Aldrich, SAD</i>)
	2 mg/mL BSA (<i>Sigma-Aldrich, SAD</i>)
Alkalni Tris pufer	100 mM Tris HCl pH 9,5
	50 mM MgCl ₂
	100 mM NaCl
	0,1% Tween 20
Rastvor za bojenje	100 µL rastvora NBT/BCIP (<i>Roche, Švajcarska</i>)
	9,9 mL alkalnog Tris pufera
PBT	2 mg/mL BSA
	0,1% Triton X-100
	1X PBS
Imunohistohemija	
Pufer za blokiranje 1	5% serum konja (<i>Sigma-Aldrich, SAD</i>)
	1X PBST
Pufer za blokiranje 2	2% serum ovce (<i>Sigma-Aldrich, SAD</i>)
	0,2% Triton X-100
	1% DMSO
	1xPBS

SSC=natrijum hloridni-natrijum citratni pufer, tRNK=transportna RNK, PBST=fosfatni pufer sa 0,1% Tween-20, BSA=goveđi albumin iz seruma, Tris=trisaminometan, NBT= nitro-plavo tetrazolijum hlorid, BCIP= so 5-bromo-4-hloro-3'-indolilfosfat *p*-toluidina, PBS= fosfatni pufer, DMSO= dimetil sulfoksid.

3.1.4. Eksperimentalne životinje

U radu su korišćene zebriće (*Danio rerio*) standardnog laboratorijskog soja AB. Kao rezultat ovog rada generisane su sledeće transgene linije:

- *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*, reporterska linija u kojoj je ekspresija zelenog fluorescentnog proteina EGFP pod kontrolom regulatornog regiona gena *ankrd1a*
- *ankrd1a^{Δ4/Δ4}*, homozigotni nosilac mutacije (delecija 4 bp) u kodirajućoj sekvenci gena *ankrd1a*
- *ankrd1b^{Δ7/Δ7}*, homozigotni nosilac mutacije (delecija 7 bp) u kodirajućoj sekvenci gena *ankrd1b*
- *ankrd2^{Δ5/Δ5}*, homozigotni nosilac mutacije (delecija 5 bp) u kodirajućoj sekvenci gena *ankrd2*
- *TgBAC(ankrd1a:EGFP);Tg(-0.8myl7:nls-DsRedExpress)*, dvostruka reporterska linija dobijena ukrštanjem linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* i linije sa obilježenim jedrima kardiomiocita, *Tg(-0.8myl7:nls-DsRedExpress)^{hsc4}* (123).

Svi eksperimenti sa zebrićama su odobreni od strane Odjeljenja za veterinu Regionalnog savjeta Darmštata Savezne Republike Njemačke i Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, broj dozvole: 323-07-05571/2017-05/2.

3.1.4.1. Uzgajanje zebrica

Zebrice su uzgajane u sistemu sa cirkulišućom vodom na temperaturi od 28,5°C, pod svjetlosnim režimom od 14 sati svjetlosti i 10 sati mraka. Jedinke su uzgajane u grupama ne većim od 5 jedinki/L vode. Ishrana se sastojala od kombinacije komercijalno dostupne specijalizovane granulaste hrane (*Scientific Dietary Service*, Engleska), lisnate hrane (*Sera*, Njemačka) i mlađi artemije. Embrioni su gajeni u standardnom E3 medijumu (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄). Stadijumi razvića su određivani po uzoru na publikaciju Kimmel i saradnika (50). Starost embriona i larvi izražena je kao broj sati nakon oplođenja (sno).

Uzgajanje zebrica rađeno je u skladu sa institucionalnim i nacionalnim preporukama o etici i dobrobiti životinja, usklađenim sa direktivom Evropske unije 2010/63/EU.

3.1.4.2. Mriješćenje zebrica

Dan pred mriješćenje, zebrice su iz tankova prebačene u mrijestilice i razdvojene po polovima pregradom. Sledećeg jutra, nakon paljenja svjetla, pregrada je uklonjena. Nakon polaganja i oplođenja, jaja su sakupljana u petri šolje sa standardnim E3 medijumom. Neoplođena jaja i mrtvi embrioni su uklanjani na svaka 24 sata.

3.1.4.3. Anestezija zebrica

Zebrice su anestezirane 0,02% rastvorom komercijalno dostupnog anestetika trikaina (etil 3-aminobenzoat metansulfonat, MS-222, *Sigma-Aldrich*, SAD) u vodi za uzgoj zebrica. Rastvor je puferisan Tris puferom do pH 7-7,5.

3.1.4.4. Žrtvovanje zebrica

Zebrice su žrtvovane produženim izlaganjem koncentrovanom trikainu (10 min, koncentracija trikaina > 0,02%) ili uranjanjem u hladnu vodu (10 min, zapreminski 1/3 vode za uzgoj i 2/3 led).

3.1.5. Bakterije

Bakterije *E. coli*, sojeva DH10B i DH5 α , gajene su na 30°C ili 37°C u tečnom LB (*Lysogeny Broth*) hranljivom medijumu (1% baktotripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 1% NaCl) uz aeraciju ili na čvrstoj LA podlozi (1% baktotripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 1% NaCl, 1,5% agar). Antibiotici dodati u medijum su imali sledeće finalne koncentracije: 100 μ g/ml za ampicilin (Amp), 30 μ g/ml za kanamicin (Kan), 30 μ g/ml za hloramfenikol (Cm) i 30 μ g/ml za tetraciklin (Tet).

3.2. Metode

3.2.1. Bioinformatička analiza sekvenci gena i proteina

Podaci o genima i proteinima korišćenim u okviru ove doktorske teze dobijeni su pretragom baze podataka *Ensembl* (124). Navedena baza uključuje automatsku i ručnu anotaciju genoma kičmenjaka, kao i zvanične nazive gena preuzete iz specijalizovane baze za zebrice, *ZFIN* (89).

Prikaz strukture gena preuzet je iz baze podataka *Ensembl*. Prikaz hromozomskih regiona u okviru analize sintenije dobijen je pomoću programa *Genomicus* V87.01 (125). Kako bi tačnost relativnog položaja gena bila osigurana, prikazani genomi su sinhronizovani sa aktuelnim verzijama u bazi podataka *Ensembl*.

Za analizu proteinskih sekvenci članova familije MARP korišćeno je više alata. Poravnanje proteinskih sekvenci urađeno je pomoću algoritma *Clustal Omega*, dostupnog na serveru evropskog bioinformatičkog instituta (EBI) (126). Sličnost i identičnost aminokiselinskih sekvenci je izračunata iz međusobnih poređenja ortologa MARP pomoću algoritma *MatGAT* (127). Motivi u proteinima

zebrice, čovjeka i miša identifikovani su uz pomoć baze podataka *SMART* (128,129) i algoritama *ePESTfind* (130) i *NLStradamus* (131).

Filogenetsko stablo je konstruisano metodom najveće vjerovatnoće (eng. *maximum likelihood*) algoritmom *PhyML* (132), na osnovu prethodnog poravnanja aminokiselinskih sekvenci. Identifikacioni brojevi poređenih proteina iz baze *Ensembl* dati su Tabeli 8.

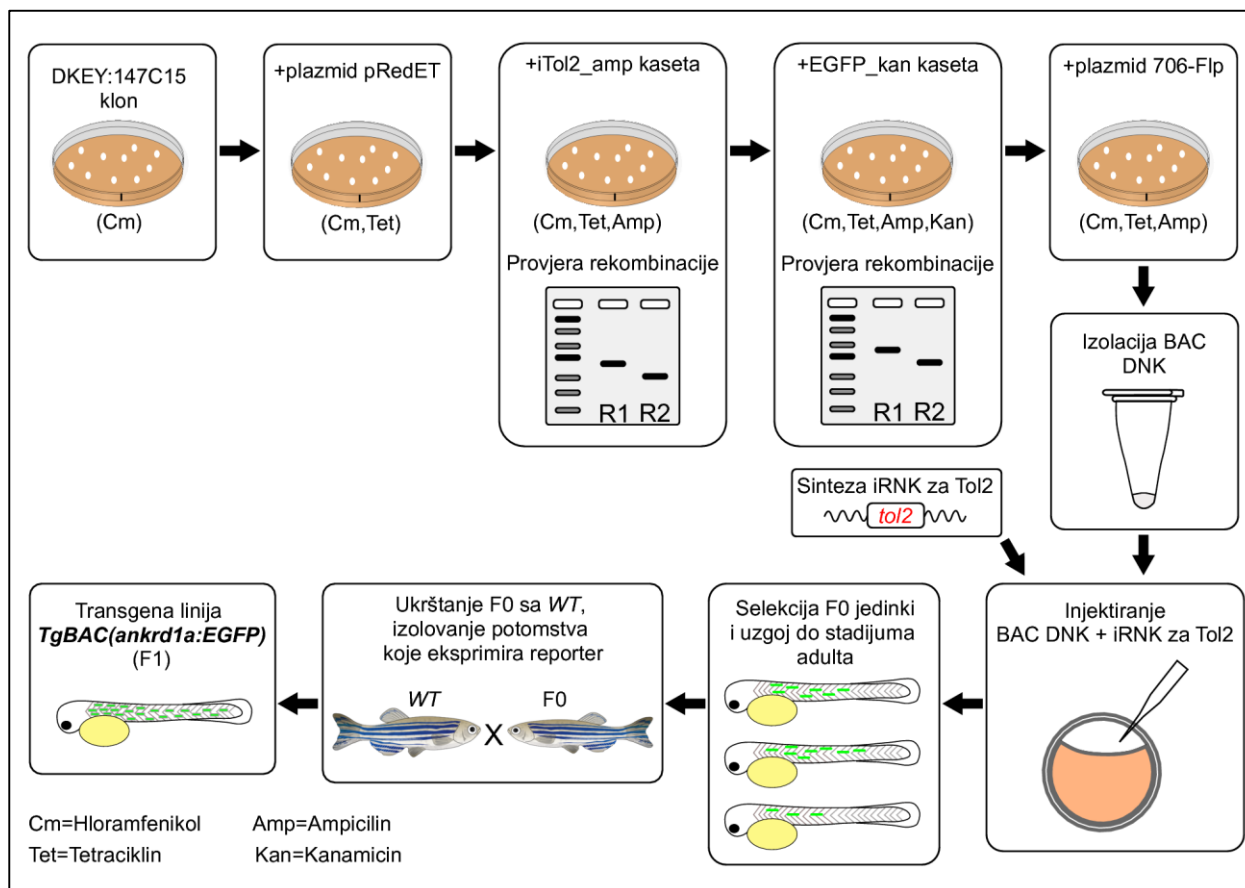
Tabela 8. Identifikacioni brojevi proteina familije MARP različitih vrsta korišćenih u *in silico* analizama

Organizam	Protein	Identifikacioni broj	Verzija genoma
<i>Danio rerio</i>	Ankrd1a	ENSDARP00000098001.3	GRCz11
	Ankrd1b	ENSDARP00000097889.2	
	Ankrd2	ENSDARP00000069315.4	
<i>Homo sapiens</i>	ANKRD1	ENSP00000360762.3	GRCh38.p7
	ANKRD2	ENSP00000359689.1	
<i>Mus musculus</i>	ANKRD1	ENSMUSP00000025718.8	GRCm38.p5
	ANKRD2	ENSMUSP00000026172.2	
<i>Gallus gallus</i>	ANKRD1	ENSGALP00000010477.2	GCA_000002315.3
	ANKRD2	ENSGALP00000012178.5	
<i>Xenopus tropicalis</i>	Ankrd1	ENSXETP000000047089.3	GCA_000004195.1
	Ankrd2	ENSXETP00000007445.3	
<i>Astyanax mexicanus</i>	Ankrd1a	ENSAMXP00000009303.1	GCA_000372685.1
	Ankrd1b	ENSAMXP00000007927.1	
	Ankrd2	ENSAMXP00000002269.1	

3.2.2. Genetičke manipulacije

3.2.2.1. Generisanje transgene linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)^{bns505}*

Generisanje transgene linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* obuhvatilo je sintezu i izolaciju konstrukta *BAC(ankrd1a:EGFP)*, sintezu iRNK za transpozazu Tol2, injeciranje smješe nukleinskih kiselina u embrione zebrice i selekciju transgenih jedinki. Proces generisanja transgene linije šematski je prikazan na Slici 10.

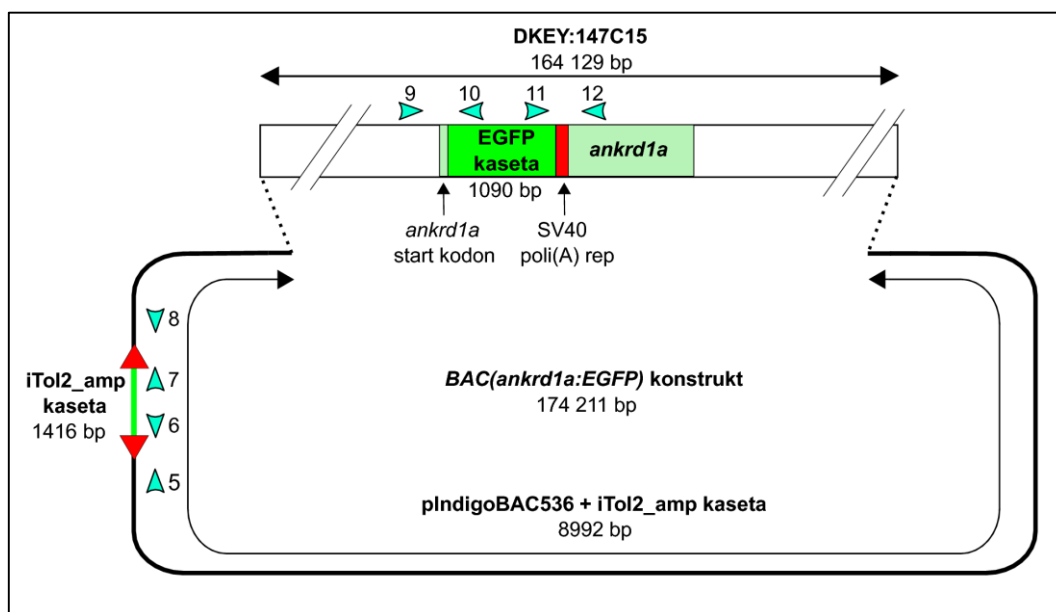


Slika 10. Pregled koraka u generisanju transgene linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*.

3.2.2.1.1. Sinteza konstrukta *BAC(ankrd1a:EGFP)*

Konstrukt *BAC(ankrd1a:EGFP)* sintetisan je po protokolu opisanom u publikaciji Bussman i Schulte-Merker (133). Protokol se bazira na korišćenju pRedET rekombinacione tehnologije (*GeneBridges*, Njemačka) i uključuje nekoliko rekombinacionih koraka koji se odvijaju u *E. coli* soja DH10B. U bazi NCBI postoji više BAC klonova koji obuhvataju lokus *ankrd1a*. Za generisanje transgene linije odabran je klon DKEY:147C15 BAC u pTarBAC vektoru (*Source BioScience*, UK). Ukupna dužina klona je 164129 bp, sa kodirajućom sekvencom *ankrd1a* na poziciji 83655- 91037 u odnosu na 5' kraj klona. U navedeni BAC vektor uklonirane su kasete iTol2_amp i EGFP_kan koje su omogućile Tol2-dirigovanu transpoziciju i ekspresiju reportera, redom. iTol2 kasetu sadrži terminalne ponovke Tol2 elementa (transpozona) neophodne za vezivanja Tol2 transpozaze i uspješnu transpoziciju ovičenog fragmenta DNK, kao i gen koji omogućava rezistenciju na antibiotik ampicilin. EGFP kasetu sadrži kodirajuću sekvencu za modifikovani prirodni zeleni fluorescentni protein (eng. *enhanced green fluorescent protein*, EGFP) i gen koji omogućava rezistenciju na antibiotik kanamicin. Graničnici za umnožavanje kasetu PCR-om su na svojim krajevima imali dodatke sekvence homologne DNK sekvenci na mjestu insercije u BAC vektor (homologne ručice 1 i

2, gledano u orijentaciji 5'-3') koje su neophodne za rekombinaciju. Lista graničnika korišćenih za sintezu konstrukta *BAC(ankrd1a:EGFP)* data je u Tabeli 1. U protokolu koji slijedi graničnici su navođeni po rednom broju iz Tabele 1. Šema konstrukta, sa pozicijama graničnika, prikazana je na Slici 11.



Slika 11. Šema konstrukta *BAC(ankrd1a:EGFP)* korišćenog za generisanje linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*. Konstrukt veličine 174211 bp sadrži klon DKEY:147C15 (164129 bp), EGFP_kan kasetu bez gena za rezistenciju na kanamicin (1090 bp) i iTol2_amp kasetu koja se nalazi u vektoru pIndigoBAC536 (8992 bp). Crvene strelice označavaju položaj homolognih ručica za transpoziciju. Graničnici, označeni brojevima kao u Tabeli 1, prikazani su plavim strelicama.

Protokol za generisanje transgene linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* je započet PCR-om u kojem je korišćena polimeraza visoke tačnosti (*PrimeStar Max*, Takara Bio, SAD) za umnožavanje kasetu za kloniranje u ishodni BAC vektor (Tabela 9).

Tabela 9. Sastav reakcione smješe i temperaturni profil PCR umnožavanja kasetu iTol2_amp i EGFP_kan.

Sastav reakcione smješe		
komponenta	zapremina	
Plazmidna DNK (<i>PCR8GW-iTol2-amp</i> ili <i>pCS2+_EGFP_kan</i>)	X μ L (5 ng)	
10 mM dNTP	2 μ L	
10 μ M graničnici 1 i 2 ili 3 i 4	po 2,5 μ L	
<i>PrimeStar Max</i> polimeraza	1 μ L	
H ₂ O	do 25 μ L	
Uslovi PCR-a		
temperatura	vrijeme	Broj ciklusa
98°C	30 s	1
98°C	10 s	30
58°C	20 s	
72°C	60 s	
72°C	5 min	1

Umnoženi fragmenti molekula DNK su provjereni elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Očekivane veličine fragmenata su bile 1516 bp za iTol2_amp i 2544 bp za EGFP_kan kasetu. Plazmidna DNK,

korišćena kao matrica za PCR, je degradovana digestijom restrikcijom enzimom DpnI (*New England Biolabs*, SAD). U reakcionu smjesu su dodata 2 μL (20 U) restrikcijom enzima, a digestija je trajala 4 sata na 37°C. Produkti PCR reakcije precipitirani su dodavanjem 5 μL 5M LiCl i 300 μL 100% etanola i inkubacijom 30 min na -20°C. Nakon taloženja centrifugiranjem (12000 g, 30 min, 4°C) pelet DNK ispran je 70% etanolom, centrifugiran (5 min, 12000 g, 4°C), osušen na sobnoj temperaturi i rastvoren u 21 μL destilovane vode. Koncentracija molekula DNK izmjerena je spektrofotometrijski (*NanoDrop 2000*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD) i dovedena do 500 ng/ μL dodavanjem destilovane vode.

Komercijalno nabavljene bakterije sa BAC vektorom zasijane su na LA podlozi sa Cm i inkubirane preko noći na 37°C. Pojedinačne bakterijske kolonije resuspendovane su u 50 μL destilovane vode. Identitet BAC vektora je provjeren umnožavanjem fragmenta koji sadrži start kodon gena *ankrd1a*, graničnicima 9 i 12. Detalji reakcije dati su u Tabeli 10.

Tabela 10. Sastav reakcionih smjesa i temperaturni profil PCR-ova kojima su proveravani rezultati međukoraka u proceduri sinteze BAC konstrukta.

Sastav reakcione smješe		Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
komponenta	zapremina			
		95	5 min	1
<i>Kappa2G Fast Ready Mix</i>	12,5 μL	94	30 s	30
graničnici (10 μM)	po 1,25 μL	58	30 s	
suspencija bakterija	1 μL	72	30 s	
H ₂ O	5 μL	72	2 min	1

Umnoženi fragment, očekivane veličine od 548 bp, je provjeren elektroforezom na 2% agaroznom gelu.

Nakon potvrde identiteta klona, bakterije su pripremljene za elektroporaciju. Prekonoćnom bakterijskom kulturom (40 μL) inokulisano je 2 mL LB medijuma sa Cm i bakterije su gajene 120 min na 37°C. Nakon taloženja centrifugiranjem 5 min na 5000 obrtaja po min (opm) bakterije su pažljivo resuspendovane u 1 mL hladne vode i centrifugirane 5 min na 5000 opm. Pranje bakterija hladnom vodom je ponovljeno. U bakterije resuspendovane u 50 μL vode dodato je 10 ng plazmida pRedET i bakterije su transformisane elektroporacijom (1800V, 25 μF , 200 Ω , vremenska konstanta 4,8-5,2). Oporavak elektroporisanih bakterija, nakon dodavanja 1 mL LB medijuma sa 20 mM D-(-)-glukozom, je trajao 60 min na 37°C. Bakterije su zatim zasijane na čvrstu LA podlogu sa Cm i Tet i inkubirane preko noći na 30°C.

Za dalji rad odabrana je jedna kolonija koja je gajena preko noći u tečnoj kulturi (LB medijum sa Cm i Tet) na 30°C. Prekonoćnom bakterijskom kulturom (150 μL) inokulisano je 1,8 mL LB medijuma u koji su dodati Cm i Tet a zatim su bakterije gajene 150 min na 30°C. Nakon dodavanja 67 μL 10% L-(-)-arabinoze, kako bi se indukovala ekspresija gena sa pRedET plazmida neophodnih za rekombinaciju, bakterije su dodatno inkubirane 60 min na 37°C. Zatim su staložene centrifugiranjem 5 min na 5000 opm, pažljivo resuspendovane pipetiranjem u 1 mL hladne destilovane vode i ponovo centrifugirane 5 min na 5000 opm. Nakon još jednog pranja hladnom vodom i taloženja, bakterijama resuspendovanim u 50 μL vode dodato je 500 ng fragmenta iTol2-amp. Uslijedila je transformacija bakterija elektroporacijom pod istim uslovima kao u prethodnom koraku. Bakterije su oporavljane dodavanjem 1 mL LB medijuma sa 20 mM D-(-)-glukozom 45 min na 37°C, nakon čega su zasijane na čvrstu LA podlogu sa Cm, Tet i Amp i inkubirane preko noći na 30°C.

Insercija iTol2_amp kasete je provjerena PCR umnožavanjem regiona koji okružuju homologne ručice. Pojedinačne kolonije (6 - 8) rastvorene su u 50 μL vode. Postavljena su dva PCR-a po koloniji: za homolognu ručicu 1 (graničnici 5 i 6) i 2 (graničnici 7 i 8). Detalji PCR-a dati su u Tabeli 10. Umnoženi fragmenti DNK provjereni su elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Prisustvo

očekivanih fragmenata dužine 420 bp (ručica 1) i 327 bp (ručica 2) potvrdilo je uspješnu integraciju iTol2_amp kasete.

Od preostalog rastvora bakterija jedne pozitivne kolonije, 20 µL iskorišćeno je za inokulaciju 1 mL LB medijuma sa Cm, Tet i Amp. Kultura je inkubirana preko noći na 30°C, nakon čega je 150 µL dodato u 1,8 mL LB medijuma sa Cm, Tet i Amp. Bakterije su gajene 150 min na 30°C. Nakon dodavanja 67 µL 10% L-(-)-arabinoze i inkubacije 60 min na 37°C, bakterije su staložene centrifugiranjem 5 min na 5000 opm. Bakterije su pažljivo resuspendovane pipetiranjem u 1 mL hladne vode i centrifugirane 5 min na 5000 opm. Nakon još jednog pranja hladnom vodom i taloženja, bakterije su resuspendovane u 50 µL vode. Zatim im je dodato 500 ng fragmenta EGFP_kan kojim su bakterije transformisane elektroporacijom pod istim uslovima kao u prethodna dva koraka. Bakterije su oporavljane dodavanjem 1 mL LB medijuma sa 20 mM D-(-)-glukozom 45 min na 37°C, nakon čega su zasijane na čvrstu LA podlogu sa Cm, Tet i Amp i inkubirane preko noći na 30°C.

Insercija EGFP_kan kasete je provjerena PCR umnožavanjem regiona ograničenog homolognim ručicama. Pojedinačne kolonije (6 - 8) su rastvorene u 50 µL destilovane vode. Postavljena su tri PCR-a po koloniji: po jedna za svaku homologu ručicu (graničnici 9 i 10, odnosno 11 i 12) i jedna koja obuhvata start kodon i reportersku kasetu (graničnici 9 i 12). Detalji PCR-a dati su u Tabeli 10. Umnoženi fragmenti DNK provjereni su elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Prisustvo očekivanih fragmenata DNK dužine 643 bp (homologna ručica 1), 480 bp (homologna ručica 2) i 2992 bp (start kodon i reporterska kaset) potvrdilo je uspješnu integraciju EGFP_kan kasete. U EGFP_kan kaseti, gen za kanamicinsku rezistenciju okružen je FRT mjestima, koja omogućavaju isjecanje ovog gena enzimom flipaza (Flp). Bakterije sa finalnim konstruktom transformisane su plazmidom 706-Flp (komponenta pRedET kita) elektroporacijom kao u prethodnim koracima. Nakon transformacije, bakterije su inkubirane 70 min na 30°C, a zatim preko noći na 37°C. Uklanjanje gena za kanamicinsku rezistenciju je provjereno zasijavanjem bakterija na čvrstu LA podlogu sa Cm, Amp i Kan (negativna kontrola) i čvrstu LA podlogu sa Cm i Amp (pozitivna kontrola).

3.2.2.1.2. Izolacija molekula BAC DNK

BAC DNK izolovana je iz prekonocne kulture gajene u 50 mL LB medijuma sa Cm i Amp na 37°C. Korišćen je kit za izolaciju plazmida veličine do 300 kb, *NucleoBond Xtra* (Clontech, SAD), po uputstvu proizvođača. Prečišćena DNK je rastvorena u 100 µL vode. Koncentracija DNK je izmjerena spektrofotometrijski (*NanoDrop 2000*, Thermo Fisher Scientific, SAD). Rastvorena BAC DNK je čuvana na 4°C do injektiranja.

3.2.2.1.3. Sinteza molekula iRNK transpozaze Tol2

Plazmid pCS-zT2TP (83) linearizovan je restrikcionim enzimom NotI-HF (*New England Biolabs*, SAD) 60 min na 37°C. Potpuna digestija potvrđena je elektroforezom na agaroznom gelu, nakon čega je linearizovani plazmid prečišćen uz pomoć kita za prečišćavanje PCR produkata (*GeneJET PCR Purification Kit*, Thermo Fisher Scientific, SAD). Kit *mMessage mMachine SP6* (Thermo Fisher Scientific, SAD) korišćen je za *in vitro* sintezu iRNK transpozaze Tol2. Sastav reakcione smješe dat je u Tabeli 11.

Tabela 11. Reakciona smješa za sintezu molekula iRNK za transpozazu Tol2

Komponenta	Količina
2x NTP/CAP	10 µL
10x reakcioni pufer	2 µL
linearizovana DNK matrica	1 µg
SP6 polimeraza	2 µL
H ₂ O	do 20 µL

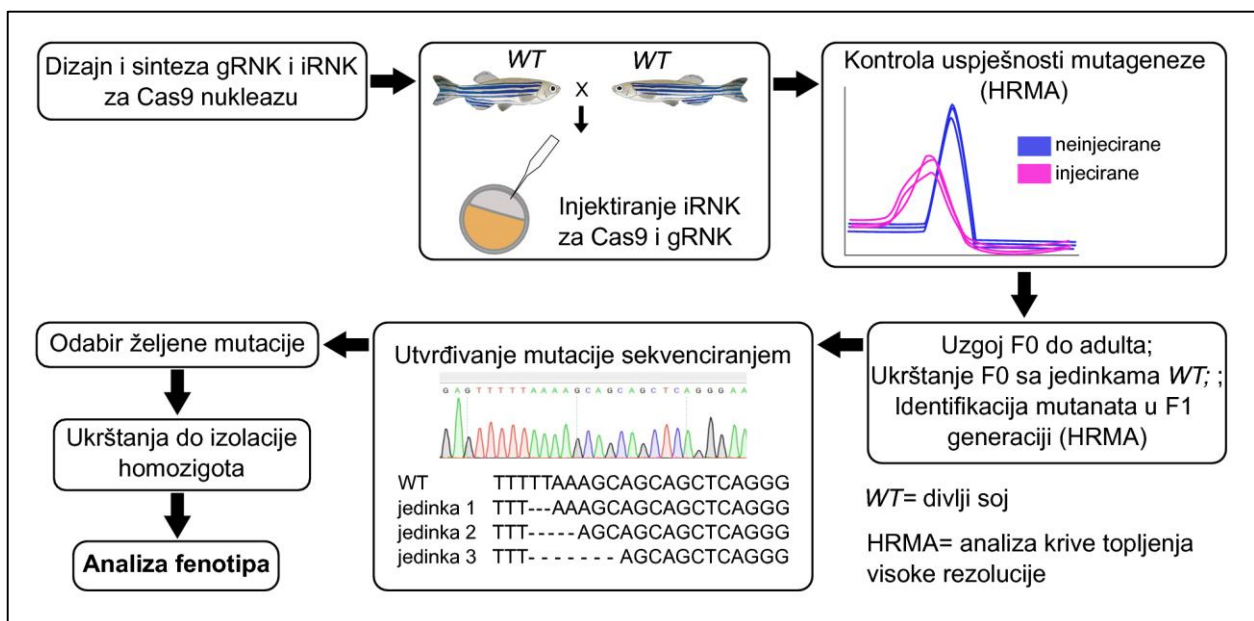
Reakciona smješa je inkubirana 60 min na 37°C, nakon čega je dodat 1 µL TURBO DNAze i inkubacija je nastavljena još 15 min na 37°C. Sintetisana RNK je prečišćena pomoću kita *RNA Clean and Concentrator-5* (Zymo Research, SAD).

3.2.2.1.4. Injektiranje embriona zebrice i selekcija transgenih jedinki

Tek oplođena jaja zebrice soja AB, na stadijumu od 1-2 ćelije, prikupljena su u posudu za injektiranje i u njihovu citoplazmu je injektirano po 1 nL smješe nukleinskih kiselina. Injekciona smješa zapremine 10 µL je sadržala 100ng *BAC(ankrd1a:EGFP)*, 300ng *tol2* iRNK, 2 µL fenol crvene boje i vodu do finalne zapremine. Injektirana jaja su prebačena u medijum E3 za gajenje embriona i inkubirana na 28,5°C. Tokom naredna 24 sata odbačena su mrtva i neoplođena jaja. Na stadijumu 48 sno embrioni su pregledani i odabrani su oni kod kojih je EGFP signal bio vidljiv. Odabrani embrioni gajeni su do adultne faze (F0 generacija). Adulti F0 generacije ukršteni su sa adultnim jedinkama divljeg (*WT*) soja AB kako bi se utvrdilo prenošenje transgena kroz germinativnu liniju u F1 generaciju. Iz F1 generacije odabrana je odgovarajuća jedinka začetnik transgene linije sa registrovanom oznakom *TgBAC(ankrd1a:EGFP)^{bns505}* (Slika 10).

3.2.2.2. Generisanje mutanata tehnologijom CRISPR/Cas9

Mutirani aleli *MARP* gena generisani su pomoću tehnologije CRISPR/Cas9. Sama procedura obuhvatala je korake sinteze vodič RNK (gRNK) i *cas9* iRNK, njihovo injektiranje u oplođena jaja zebrice i genotipizaciju injektiranih jedinki (Slika 12).



Slika 12. Šema koraka u generisanju mutacija kod zebrice CRISPR/Cas9 metodom.

3.2.2.2.1. Sinteza gRNK

Sinteza gRNK izvedena je *in vitro* transkripcijom sa plazmida pT7-gRNA (103), koji sadrži segment crRNK:tracrRNK, okosnicu gRNK, na čijem je 5' kraju kloniran oligonukleotid koji određuje specifičnost gRNK za ciljni region u genomske DNK (103). Koraci u sintezi gRNK su bili: linearizacija plazmida pT7-gRNA, kloniranje dvolančanog oligonukletida u plazmid pT7-gRNA, *in vitro* sinteza vRNK i njeno prečišćavanje.

3.2.2.2.1.1. Linearizacija plazmida pT7-gRNA

Plazmid pT7-gRNA linearizovan je restrikcionim enzimom BsmBI (10 U/ μ L, *New England Biolabs*, SAD). Sastav reakcione smješe dat je u Tabeli 12.

Tabela 12. Reakciona smješa za linearizacije plazmida pT7-gRNA.

Komponenta	Količina
10x NEB 3.1 pufer	4 μ L
BsmBI	5 μ L
plazmid	5 μ g
H ₂ O	do 50 μ L

Smješa je inkubirana 60 min na 55°C. Nakon inkubacije, cjelokupna smješa je nanijeta na 1,5% agarozni gel i elektroforezom su razdvojeni produkti digestije. Fragment DNK, veličine 2500 bp, koji po veličini odgovara linearizovanom plazmidu, je prečišćen iz gela pomoću kita za ekstrakciju DNK iz gela (*GeneJET Gel Extraction Kit*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD), po protokolu proizvođača.

3.2.2.2.1.2. Hibridizacija oligonukleotida

Oligonukleotidi koji određuju specifičnost gRNK su dizajnirani tako da sadrže, osim sekvence specifične za ciljno mjesto u genomskoj DNK, dodatne nukleotide na 5' i 3' krajevima koji omogućavaju restrikciono kloniranje. Lista oligonukleotida (*Sigma-Aldrich*, SAD) korišćenih za sintezu gRNK data je u Tabeli 13.

Tabela 13. Primarne sekvence parova oligonukleotida korišćenih za sintezu gRNK. Nukleotidi koji odgovaraju genomskoj sekvenci zebrice su podebljani. Oligonukleotidi su prikazani u orijentaciji 5'-3'.

Ciljni gen	Oligonukleotid
<i>ankrd1a</i>	F: TAGGAGAAATATTTAGTGGATGG R: AAACCCATCCACTAAATATTTCT
<i>ankrd1b</i>	F: TAGGCGAGGTAAC TTTGATCAT R: AAACATGATCAAAAGTTACCTCG
<i>ankrd2</i>	F: TAGGAAAAGTTTCTGGACGATGG R: AAACCCATCGTCCAGAAACCTTT

Komplementarni oligonukleotidi su hibridizovani u dvolančane molekule DNK radi kloniranja u linearizovan plazmid pT7-gRNA. Sastav smješe u kojoj se odvijala hibridizacija oligonukleotida dat je u Tabeli 14.

Tabela 14. Sastav smješe za hibridizaciju oligonukleotida prije kloniranja u plazmid pT7-gRNA.

Komponenta	Količina
F-oligonukleotid (100 μ M)	2 μ L
R-oligonukleotid (100 μ M)	2 μ L
10x NEBuffer	2 μ L
H ₂ O	14 μ L

Smješa je inkubirana 5 min na 95°C i ostavljena da se postepeno ohladi do sobne temperature 120 min.

3.2.2.2.1.3. Kloniranje dvolančanog fragmenta DNK u plazmid pT7-gRNA

Za ligaciju hibridizovanih oligonukleotida i linearizovanog plazmida pT7-gRNA korišćena je T4 ligaza (*Promega*, SAD). Sastav ligacione smješe dat je u Tabeli 15.

Tabela 15. Sastav ligacione smješe za kloniranje dvolančanih fragmenata DNK u pT7-gRNA.

Komponenta	Količina
10x pufer za T4 ligazu	1 μ L
T4 ligaza	1 μ L
hibridizovani oligonukleotidi	7 μ L
linearizovan plazmid (50-70 ng/ μ L)	1 μ L

Ligaciona smješa je inkubirana 60 min na sobnoj temperaturi. Kompetentne bakterije (soj DH5 α) transformisane su sa 5 μ L ligacione smješe i zasijane na LA podlogu koja sadrži Amp. Nakon prekoćne inkubacije na 37°C, po dvije izrasle kolonije su zasijane u 3 mL LB medijuma i gajene preko noći na 37°C. Iz 3 mL prekoćne kulture izolovana je plazmidna DNK pomoću kita za izolaciju plazmida (*GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific, SAD*) po uputstvu proizvođača. Koncentracija DNK je izmjerena na spektrofotometru (*NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, SAD*). Radi provjere sekvence, plazmidi su uslužno sekvencirani (*ACGT Corporation, Toronto, Kanada*) sa standardnim M13 F graničnikom (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3').

3.2.2.2.1.4. *In vitro* sinteza gRNK

Prije *in vitro* transkripcije gRNK, plazmidi, u koje su uklonirani hibridizovani oligonukleotidi koji određuju specifičnost gRNK, su linearizovani restrikcionim enzimom BamHI (*New England Biolabs, SAD*). Sastav reakcione smješe za linearizaciju plazmida dat je u Tabeli 16.

Tabela 16. Sastav reakcione smješe za linearizaciju plazmida pT7-gRNA sa kodirajućom sekvencom za gRNK.

Komponenta	Količina
plazmid	5 μ g
BamHI-HF	5 μ L
10x pufer Cut Smart	5 μ L
H ₂ O	do 50 μ L

Smješa je inkubirana 60 min na 37°C, nakon čega je agaroznom gel elektroforezom provjerena uspješnost digestije. Linearizovan plazmid je prečišćen kitom za prečišćavanje produkata PCR-a (*GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Fisher Scientific, SAD*), po protokolu proizvođača.

Sinteza gRNK sa linearizovanog plazmida urađena je pomoću kita *MEGashortscript T7 (Ambion, SAD)*. Sastav reakcione smješe dat je u Tabeli 17.

Tabela 17. Sastav reakcione smješe za sintezu *in vitro* gRNK.

Komponenta	Količina
10x reakcioni pufer	1 μ L
rastvor ATP-a	1 μ L
rastvor CTP-a	1 μ L
rastvor GTP-a	1 μ L
rastvor UTP-a	1 μ L
enzim T7	1 μ L
linearizovan plazmid pT7-gRNA	4 μ L (500 ng)

Smješa je inkubirana 120 min na 37°C, nakon čega je dodat 1 μ L TURBO DNAze i inkubacija je nastavljena još 15 min na 37°C. Sintetisana RNK je prečišćena pomoću kita za prečišćavanje RNK (*RNA Clean and Concentrator 5, Zymo Research, SAD*). Koncentracija RNK je izmjerena na spektrofotometru (*NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, SAD*). Kvalitet RNK je provjeren

elektroforezom na nenedaturišućem 2% agaroznom gelu. Traka u gelu jasnih ivica ukazivala je na zadovoljavajuć kvalitet RNK.

3.2.2.2.2. Sinteza iRNK za Cas9

Kao matrica za sintezu iRNK sa koje se translacija protein Cas9 korišten je plazmid pT3TS-nlsCas9nls (103). Plazmid je najprije linearizovan restrikcijom enzimom XbaI (*New England Biolabs*, SAD). Sastav reakcione smjese dat je u Tabeli 18.

Tabela 18. Sastav reakcione smjese za linearizaciju plazmida pT3TS-nlsCas9nls.

Komponenta	Količina
plazmid	5 µg
XbaI-HF	5 µL
10x pufer Cut Smart	5 µL
H ₂ O	do 50 µL

Smjesa je inkubirana 60 min na 37°C. Elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu izdvojen je fragment DNK veličine 7,3 kb koji je zatim prečišćen kitom za izolaciju DNK iz gela (*GeneJET Gel Extraction Kit*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD).

Transkript je sintetisan *in vitro*, kitom *mMESSAGE mMACHINE T3* (*Ambion*, SAD). Sastav reakcione smjese dat je u Tabeli 19.

Tabela 19. Sastav reakcione smjese za sintezu iRNK za Cas9 nukleazu.

Komponenta	Količina
10x reakcioni pufer	1 µL
2xNTP/CAP	5 µL
T3 polimeraza	1 µL
linearizovan plazmid	500 ng
H ₂ O	do 10 µL

Smjesa je inkubirana 60 min na 37°C, nakon čega je dodat 1 µL TURBO DNAze i inkubacija je nastavljena još 15 min. Sintetisana RNK je prečišćena pomoću kita *RNA Clean and Concentrator 5* (*Zymo Research*, SAD). Koncentracija RNK je izmjerena na spektrofotometru *NanoDrop 2000* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD). Kvalitet RNK je provjeren elektroforezom na nenedaturišućem 1,5% agaroznom gelu. Traka u gelu jasnih ivica ukazivala je na zadovoljavajuć kvalitet RNK.

3.2.2.2.3. Injektiranje gRNK i iRNK za Cas9 u embrione zebrice

U citoplazmu ćelija embriona zebrice AB soja, na stadijumu od 1 do 4 ćelije, injektirano je po 1 nL smjese RNK. Injekciona smjesa zapremine 10 µL je sadržala 50 – 100 ng/µL gRNK, 500 ng/µL iRNK za Cas9, 1 µL fenol crvene boje i vodu do finalne zapremine. Tokom naredna 24 sata odbačena su mrtva i neoplođena jaja. Nakon 24 sata, embrioni su pregledani i odabrano je po 8 embriona za genotipizaciju i provjeru uspješnosti mutageneze.

3.2.2.2.4. Genotipizacija mutanata

Provjera uspješnosti uvođenja mutacija u gene *ankrd1a*, *ankrd1b* i *ankrd2* je rađena 24 sata nakon injektiranja gRNK i iRNK za Cas9. Iz svake grupe injektiranih embriona izdvojeno je po 8 embriona za analizu HRMA metodom kako bi se utvrdilo uvođenje promjena u nukleotidnoj sekvenci ciljnog alela. Ukoliko bi HRMA metoda potvrdila mutagenezu u nasumičnom uzorku, jedinke iz te grupe su odgajane radi daljeg ukrštanja.

3.2.2.2.4.1. Izolacija genomske DNK iz embriona zebriće

Embrioni su pojedinačno prebačeni u plastičnu tubu i uklonjen je višak medijuma u kome su gajeni. Zatim su inkubirani u 50 µL 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 min na 95°C. Nakon hlađenja dodato je 5 µL proteinaze K (10 mg/mL) i inkubacija je nastavljena preko noći na 55°C. Proteinaza K je inaktivirana denaturacijom 10 min na 95°C. Nerastvoreni materijal je uklonjen kratkim centrifugiranjem na 13000 opm.

3.2.2.2.4.2. Analiza krive topljenja DNK visoke rezolucije (HRMA)

Analizom krive topljenja DNK visoke rezolucije (HRMA) utvrđuje se prisustvo izmjene u nukleotidnoj sekvenci ispitivanog alela. Ova post-PCR analitička metoda se zasniva na detekciji razlika u tačkama topljenja hibridizovanih fragmenata DNK sa i bez mutacije.

Genomska DNK izolovana iz embriona služila je kao matrica za genotipizaciju metodom HRMA. U reakciji je korišćen *DyNAmo Flash Sybr Green qPCR* kit (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), a sinteza i detekcija su izvođene na *Eco* sistemu za PCR u realnom vremenu (*Illumina*, SAD). Sastav reakcione smješe dat je u Tabeli 20.

Tabela 20. Sastav reakcione smješe za HRMA.

Komponenta	Količina
2x <i>Sybr Green master mix</i>	5 µL
10 µM graničnik F	0,5 µL
10 µM graničnik R	0,5 µL
H ₂ O	3 µL
DNK	1 µL

Graničnici su izlistani u Tabeli 2. Ukoliko je pomoću metode HRMA potvrđeno prisustvo promjene na ciljnom alelu, preostali injektirani embrioni su gajeni do adultnog stadijuma i ukršteni sa *WT* zebrićama AB soja u cilju dobijanja potomstva sa mutacijom na jednom alelu (F1 generacija).

3.2.2.2.4.3. Sekvenciranje molekula DNK

Mutacije u jedinkama F1 generacije su detektovane sekvenciranjem regiona DNK u koji je mutacija uvedena. PCR-om je umnožen fragment koji obuhvata region mutacije. Za PCR je korišćen kit *ThermoPrime 2x ReddyMix* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD). Sastav reakcione smješe dat je u Tabeli 21. Graničnici korišćeni za umnožavanje fragmenata DNK koji obuhvataju region u koji je uvedena mutacija dati su u Tabeli 3.

Nakon PCR-a, fragmenti DNK su prečišćeni kitom za prečišćavanje PCR fragmenata (*GeneJET PCR Purification Kit*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD) i klonirani u *pGEM-T Easy* vektor (*Promega*, SAD), po uputstvu proizvođača. S obzirom da F1 generaciju čine isključivo heterozigoti za mutaciju, za svaku jedinku izolovani su plazmidi iz tri kolonije kako bi se povećala vjerovatnoća pronalaženja plazmida koji nosi alel sa mutacijom. Plazmidna DNK je izolovana kitom (*GeneJET Plasmid Miniprep* kit, *Thermo Fisher Scientific*, SAD), po uputstvu proizvođača. Plazmidi su sekvencirani standardnim T7 F graničnikom (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') u servisu (*ATCG Corporation*, Toronto, Kanada).

Tabela 21. Sastav reakcione smješe PCR-a za umnožavanje regiona DNK u kome se nalazi mutacija.

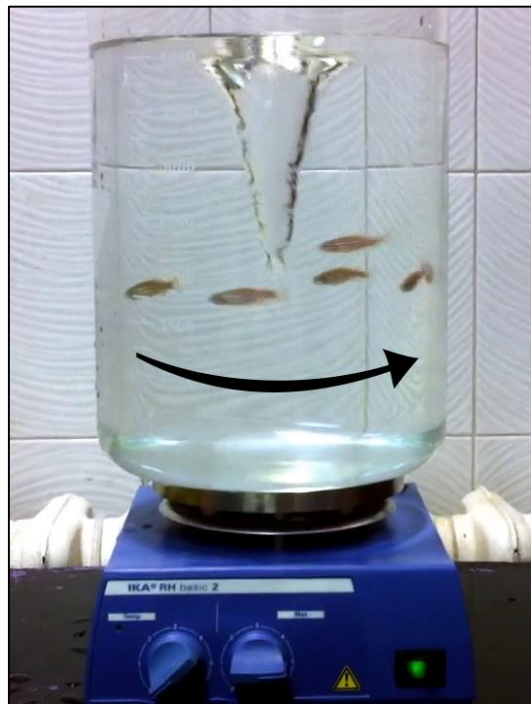
Komponenta	Količina
2x <i>ReddyMix master mix</i>	5 µL
10 µM graničnik F	0,5 µL
10 µM graničnik R	0,5 µL
DNK	2 µL
H ₂ O	2 µL

Nakon što su sekvence mutiranih alela potvrđene, dalja genotipizacija jedinki je rađena metodom HRMA.

3.2.3. Manipulacije adultnim jedinkama zebrice

3.2.3.1. Trening zebrica forsiranim plivanjem u viru

Za modelovanje povećane fizičke aktivnosti razvijen je protokol za forsirano plivanje zebrica u viru. Laboratorijska čaša zapremine 5 L (VWR, SAD), napunjena sa 4 L vode iz cirkulišućeg sistema za uzgoj zebrica, postavljena je na magnetnu mješalicu. Okretanjem magneta dužine 6 cm i debljine 0,5 cm, generisana je vodena struja i formiran je vir. Podešavanjem brzine okretanja magneta mijenjana je brzina vodene struje, koja je relativno određivana dubinom vira. Kada se zebrice nađu u viru, njihovo prirodno ponašanje je plivanje nasuprot vodenoj struji (Slika 13). Protokol je uključivao navikavanje životinja na nove uslove: u prva dva dana životinje su izlagane manjoj brzini vodene struje koja je generisala vir dubine 2 do 3 cm, u trajanju od po tri sata dnevno. Ovu brzinu životinje lako savlađuju, a privikavanje je neophodno kako bi naučile da izbjegavaju upadanje u sam vir. Od trećeg dana brzina je postepeno povećavana dok dubina vira nije dostigla 10 cm. Pri ovoj brzini vršena je selekcija životinja koje su sposobne da izbjegniju upadanje u vir. Maksimalan broj životinja u čaši je bio 10, a minimalan 4. Režim plivanja od trećeg dana se sastojao od dvije runde od po tri sata plivanja, sa prekidom od sat vremena između, radi odmora i ishrane. Nakon završenih 6 sati plivanja, životinje su vraćane u svoje tankove.

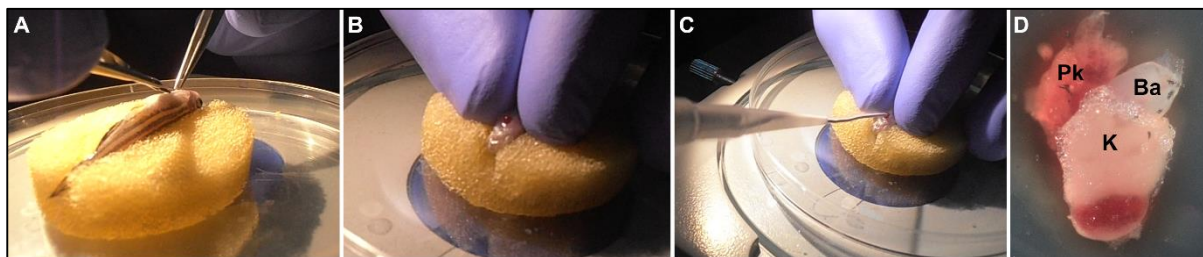


Slika 13. Eksperimentalna postavka treninga zebrica forsiranim plivanjem u viru. Zebrice plivaju nasuprot vodenoj struji čiji je smjer označen strjelicom.

3.2.3.2. Kriopovreda srca zebrice

Kao model infarkta miokarda primjenjivana je metoda kriopovrede komore srca zebrice metalnom sondom ohlađenom u tečnom azotu. Kontakt između sonde i komore dovodi do smrzavanja tkiva i masovne ćelijske smrti u regionu povrede, praćene depozicijom fibrina i kolagena. Metoda je detaljno opisana u publikaciji Gonzalez-Rosa i saradnika (134). Ukratko, anesteziranoj životinji je hirurški otvorena perikardijalna duplja i na izloženu komoru je prislonjena ohlađena sonda (Slika 14). Kontakt

je trajao do trenutka topljenja leda formiranog na površini tkiva, u kom se sonda mogla odvojiti od komore bez mehaničkog oštećenja tkiva. Nakon izvršenog zahvata, životinja je vraćena u vodu do buđenja iz anestezije i nakon toga vraćena u svoj tank na prirodni oporavak.



Slika 14. Procedura kriopovrede srca zebrice. (A) Otvaranje perikardijalne duplje pažljivim zasjecanjem kože i vezivnog tkiva. (B) Blagim pritiskom na tijelo zebrice srce je istisnuto izvan tijela. Na ovom stupnju se završava zahvat kod lažno operisane grupe. (C) Kriopovreda se izvodi prislanjanjem ohlađene sonde na površinu komore srca. (D) Izgled povrijeđenog srca drugog dana nakon povrede. Na komori je vidljiva povreda (tamno crveno) koja obuhvata oko 20% zapremine komore. Pk=pretkomora, K=komora, Ba=Bulbus arteriosus (odvodni trakt).

3.2.4. Analiza ekspresije gena na nivou molekula RNK metodom RT-qPCR

Relativni nivo genske ekspresije je određivan kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu (eng. *real time-quantitative* PCR, RT-qPCR). Nakon izolacije molekula RNK iz embriona, larvi ili tkiva adulta zebrice sintetisana je cDNK koja je služila kao matrica u reakciji RT-qPCR-a.

3.2.4.1 Izolacija molekula RNK

Prije izolacije molekula RNK, mikroskopskim posmatranjem je utvrđen odgovarajući stadijum razvića embriona i larvi, nakon čega su embrioni mehanički dehorionisani po potrebi. Pojedinačne biološke uzorke činile su grupe od po 10 embriona ili larvi istog stadijuma razvića.

Tkiva izolovana iz adultnih jedinki disekcijom su mehanički usitnjena prije homogenizacije. Uzorak jednog biološkog replikata su činila spojena srca ili skeletni mišići dvije jedinke, kako bi se osigurao dovoljan prinos RNK i umanjile varijacije među uzorcima.

Embrioni, larve ili tkivo adulta su homogenizovani u reagensu *TRIzol* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) uz pomoć uređaja *Bullet Blender* (*Next Advance*, SAD). Nakon dodavanja 0,2 mL hloroforma (*Sigma-Aldrich*, SAD) na 1 mL homogenata, vorteksovanja i centrifugiranja, RNK iz vodene faze je prečišćena vezivanjem za matriks kolonice kita *RNeasy Mini kit* (*Qiagen*, Njemačka). Prečišćavanje je rađeno po uputstvu proizvođača. RNK je rastvarana u vodi bez nukleaza, koncentracija joj je određivana spektrofotometrijski na aparatu *NanoDrop 2000* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD). Kvalitet RNK je procijenjen na osnovu odnosa apsorpcije na talasnim dužinama 260 i 280 nm (A260/A280). Izolovana RNK je čuvana na -80°C.

3.2.4.2. Sinteza molekula cDNK

Za sintezu cDNK su korišćeni isključivo uzorci RNK kod kojih je odnos A260/A280 iznosio 1,8-2,0. cDNK je sintetisana reverznom transkripcijom kitovima *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (*Invitrogen*, SAD), *iScript cDNA Synthesis* (*BioRad*, SAD) ili *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) po uputstvima proizvođača. Sintetisana cDNK je čuvana na -20°C.

3.2.4.3. Kvantitativni PCR u realnom vremenu

Fragmenti cDNK umnoženi su uz pomoć graničnika navedenih u Tabeli 4 i reagensa *DyNAmo ColorFlash SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, SAD) ili *Hot FIREpol EvaGreen qPCR Mix Plus* (Solis BioDyne, Estonija). Korišćeni su aparati *CFX Connect Real-Time Detection System* (Bio-Rad, SAD) ili *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, SAD). Sve reakcije su rađene u tehničkom triplicatu. Kao referentni transkript za normalizaciju u analizi rezultata korišćen je transkript gena za ribozomski protein L13a subjedinice 60S (*rpl13a*). Ekspresija gena *rpl13a* je bila konstantna tokom razvića i na njegovu ekspresiju nisu uticali povećana fizička aktivnost ili kriopovreda srca. Sastav reakcionih smješa za RT-qPCR data je u Tabeli 22.

Tabela 22. Sastav reakcionih smješa za kvantifikaciju transkripata metodom RT-qPCR.

Komponenta		Količina	
<i>Hot FIREpol EvaGreen qPCR Mix Plus</i>	<i>DyNAmo ColorFlash SYBR Green Master Mix</i>	4 μ L	5 μ L
Graničnici (10 μ M)		po 5 μ L	
cDNK		500 ng	
H ₂ O		do 10 μ L	

Reakcija umnožavanja fragmenata DNK imala je sledeći temperaturni profil: 15 s na 95°C; 40 ciklusa po 20 s na 60°C (za *DyNAmo ColorFlash SYBR Green*) ili po 60 s na 60°C, praćeno sa 32 s na 72°C (za *Hot FIREpol EvaGreen*).

Nakon umnožavanja, analizirana je kriva disocijacije u cilju provjere specifičnosti umnožavanja. Rezultati umnožavanja su analizirani metodom $\Delta\Delta C_t$ i izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

3.2.5. Lokalizacija transkripta *in situ* RNK hibridizacijom

Lokalizacija transkripata *MARP* određivana je *in situ* RNK hibridizacijom, korišćenjem DIGomobilježenih RNK proba. Jednolančane RNK probe, komplementarne ciljnom transkriptu, su nakon hibridizacije detektovane bojenom reakcijom supstrata sa alkalnom fosfatazom, konjugovanom sa anti-DIG antitijelom.

3.2.5.1. Kloniranje proba za *in situ* RNK hibridizaciju

Fragmenti cDNK *ankrd1a*, *ankrd1b* i *ankrd2*, koji su korišćeni kao matrica za sintezu DIGomobilježenih RNK proba, su umnoženi PCR-om (Tabela 23). Graničnici korišćeni za PCR umnožavanje matrica dati su u Tabeli 5.

Tabela 23. Sastav reakcione smješe i temperaturni profil PCR sinteze fragmenata cDNK *ankrd1a*, *ankrd1b* i *ankrd2*.

Sastav reakcione smješe		Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
komponenta	količina	95	3 min	1
<i>2x Kappa 2G Ready Mix</i> (Kappa Biosystems, SAD)	25 μ L	95	15 s	35
graničnici (10 μ M)	po 2,5 μ L	60	15 s	
DNK matrica	100 ng	72	15 s	
H ₂ O	do 50 μ L	72	1 min	1

Sintetisani fragmenti prečišćeni su kitom za prečišćavanje produkata PCR-a (*GeneJET PCR Purification Kit*, Thermo Fisher Scientific, SAD), prema uputstvu proizvođača. Fragmenti DNK uklonirani su u vektor *pGEM-T Easy* (Promega, SAD), po uputstvu proizvođača. Nakon provjere

bakterijskih klonova, plazmidi su izolovani kitom za izolaciju plazmida (*GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific, SAD*) i sekvenciranjem je potvrđena tačnost sekvence kloniranih fragmenata.

3.2.5.2. Sinteza RNK proba obilježenih DIG-om

RNK probe obilježene DIG-om za *ankrd1a*, *ankrd1b*, *ankrd2* i *myod* sintetisane su *in vitro* pomoću kitova *mMessage mMachine T7* ili *SP6 (Thermo Fisher Scientific, SAD)*. Kao matrica korišćeni su plazmidi linearizovani restrikcijom enzimom *SpeI* ili *SacII (New England Biolabs, SAD)*, u zavisnosti da li se sintetiše „*antisense*“ proba komplementarna ciljnom transkriptu ili „*sense*“ proba koja je služila kao negativna kontrola. Reakciona smješa i uslovi inkubacije su isti kao za sintezu iRNK za Tol2 transpozazu (poglavlje 3.2.2.1.3.) sa razlikom što je kao izvor nukleotida u reakciji sinteze DIG-om obilježenih RNK proba korišćeno 2 μ L *DIG RNA labeling mix (Roche, Švajcarska)*. Nakon sinteze i tretmana DNazom, po uputstvu proizvođača, RNK je prečišćena pomoću kita *RNA Clean and Concentrator-5 (Zymo Research, SAD)*.

3.2.5.3. In situ RNK hibridizacija na embrionima i larvama zebrice

Dehorionisani embrioni i larve različitog stadijuma razvića fiksirani su u 4% paraformaldehidu (PFA)/PBS preko noći na 4°C. Nakon fiksacije uzorci su isprani tri puta u puferu PBST (PBS, 0,1% Tween-20), nakon čega su dehidratirani inkubacijom u seriji rastvora metanola (25%, 50% i 75% metanol/PBST), po 5 min. Uzorci su zatim prebačeni u 100% metanol i čuvani na -20°C.

Procedura *in situ* RNK hibridizacije započeta je rehidratacijom uzorka u seriji rastvora metanola (75%, 50% i 25% metanol/PBST) po 5 min. Uzorak je zatim ispran rastvorom PBST, tri puta po 5 min, i permeabilizovan proteinazom K (10 μ g/mL, *Thermo Fisher Scientific, SAD*) na 37°C. Dužina inkubacije sa proteinazom K je zavisila od starosti embriona i larvi (Tabela 24).

Tabela 24. Vrijeme permeabilizacije embriona i larvi zebrice proteinazom K.

Starost embriona/larve (sno)	Dužina inkubacije sa proteinazom K (min)
24	5
48	10-15
72	60-90
120	75-120

sno=sati nakon oplođenja.

Reakcija permeabilizacije zaustavljena je ispiranjem uzorka PBST-om i fiksacijom u 4% PFA/PBS 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije, uzorak je ispiran rastvorom PBST 4 puta po 5 min. Prehibridizacija uzorka u hibridizacionom puferu (Tabela 7) je trajala 2-5 sati na 65°C, nakon čega su uzorci inkubirani sa 100 ng RNK probe obilježene DIG-om i rastvorene u hibridizacionom puferu, na 65°C preko noći. Zatim je hibridizacioni pufer sa RNK probom postepeno zamjenjen SSC puferom kroz seriju ispiranja na 65°C. U narednim koracima korišćen je hibridizacioni pufer bez tRNK i heparina. Uzorak je sukcesivno inkubiran po 10 min u rastvorima: 75% hibridizacioni pufer/2X SSC, 50% hibridizacioni pufer/ 2X SSC, 25% hibridizacioni pufer/ 2X SSC i SSC (2 puta). Sledeća dva pranja sa 0,2X SSC su trajala po 30 min na 70°C. SSC pufer je zatim postepeno zamijenjen puferom PBST, ispiranjem uzorka na sobnoj temperaturi, po 10 min, u rastvorima 75% 0,2X SSC/PBST, 50% 0,2X SSC/PBST i 25% 0,2X SSC/PBST. Uslijedilo je posljednje ispiranje puferom PBST, 10 min. Uzorci su zatim inkubirani u rastvoru za blokiranje, 3-4 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je uzorak inkubiran sa anti-DIG antitijelom konjugovanim sa AP i rastvorenim u puferu za blokiranje preko noći, na 4°C. Uslijedila je serija ispiranja puferom PBST, 6 puta po 15 min uz blago mješanje na klackalici, a zatim sa alkalnim Tris puferom (Tabela 7) tri puta po 5 min. Bojenje uzorka hromogenim supstratom NBT/BCIP (rastvor za bojenje, Tabela 7) trajalo je od 30 min do 1 sat, uz

provjeru pod mikroskopom. Za vrijeme bojenja uzorci su bili zaštićeni od svjetlosti. Nakon što je nivo bojenja postao zadovoljavajuć, rastvor za bojenje je uklanjan ispiranjem PBST-om, tri puta po 15 min, na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorak je fiksiran u 4% PFA/PBS 30 min i čuvan u PBST-u na 4°C do mikroskopiranja. Uzorak je pripremljen za mikroskopiranje montiranjem u 1% agarozu sa niskom tačkom topljenja (NueSieve GTG agarose, *FMC Bioproducts*, SAD) u šoljama sa staklenim dnom (*Sarstedt*, Njemačka).

3.2.5.4. *In situ* RNK hibridizacija na presjecima smrznutog srca

Izolovana srca fiksirana su u 4% PFA/PBS na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 min, nakon čega su isprana puferom PBS i inkubirana u seriji rastvora saharoze rastvorene u PBS-u (10% i 20% saharoza/PBS dok srca ne potonu, 30% saharoza/PBS preko noći) radi dodatne dehidracije. Srca su potom prebačena u medijum Tissue-Tek O.C.T. (*Sakura*, SAD) i smrznuta na suvom ledu. Od smrznutih tkiva kriotomom su pravljene presjeci debljine 10 µm i prenijeti na predmetna stakla *SuperFrost Ultra Plus* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD). Preparati su čuvani na -80°C.

Prema protokolu za *in situ* RNK hibridizaciju sve inkubacije preparata u rastvorima vršene su na sobnoj temperaturi, osim ako nije drugačije naznačeno. Preparati sa kriopresjecima srca su temperirani oko 20 min i fiksirani u rastvoru 4% PFA/PBS 20 min. Nakon ispiranja PBS-om dva puta po 5 min, tkivo srca je permeabilizovano proteinazom K rastvorenom u PBS-u (5 µg/mL) tokom 30 min. Preparati su ispirani 5 min PBS-om, a zatim ponovo tretirani 15 min sa 4% PFA/PBS. Nakon kratkog ispiranja u destilovanoj vodi (10 sek) preparati su 10 min acetilovani u rastvoru 0,25% anhidrid sirćetne kiseline/0,1M trietanolamin-HCl pH 8,0 i ispirani PBS-om u trajanju od 5 min. Prehibridizacija je trajala 1-4 č, a hibridizacija sa obilježenom RNK probom (2 ng/µL) 12-16 sati na 70°C, u hibridizacionom puferu (Tabela 7). Preparati su zatim isprani puferom 2xSSC 2 puta po 15 min, na 60°C i jednom 5 min. Uslijedila je inkubacija sa RNazom A (10 µg/mL) rastvorenom u 2X SSC, u trajanju od 30 min na 37°C. RNaza A, koja degraduje jednolančanu RNK, je uklonjena ispiranjem preparata puferima 2X SSC (dva puta po 5 min) i 0,2X SSC (dva puta po 30 min na 60°C i jednom 2 min). Uslijedila su dva ispiranja po 20 min rastvorom PBT (Tabela 7). Preparati su blokirani 60 min u rastvoru 10% serum ovce/PBT, u vlažnoj komori. Inkubacija sa anti-DIG antitijelom konjugovanim sa AP razblaženim u puferu za blokiranje je vršena preko noći na 4°C. Antitijelo je uklonjeno ispiranjem tri puta po 20 min PBT-om. Nakon dva pranja po 5 min alkalnim puferom preparati su inkubirani sa hromogenim supstratom BM Purple (*Roche*, Švajcarska) na 4°C u mraku, do pojave signala (do tri dana). Nakon 2 ispiranja PBS-om preparati su montirani hidrosolubilnim medijumom (*Mowiol*, *Sigma-Aldrich*, SAD).

3.2.6. Histološka bojenja

3.2.6.1. Imunohistohemijska detekcija proteina larvi zebrice

Larve starosti 96 sno su fiksirane u 4% PFA/PBS preko noći, na 4°C. Fiksirane larve su isprane puferom PBS i dehidratirane sukcesivno u tri rastvora metanola rastuće koncentracije (25%, 50% i 75% metanol/PBS), po 10 min, na sobnoj temperaturi. Sve dalje inkubacije su tekle na sobnoj temperaturi, osim ako nije drugačije naznačeno. Nakon dehidracije larve su čuvane u 100% metanolu na -20°C. Prije imunohistohemijskog bojenja larve su rehidratirane u tri rastvora metanola opadajuće koncentracije (75%, 50% i 25% metanol/PBS), po 10-15 min. Nakon 2 pranja po 5 min PBST-om uzorci su permeabilizovani kolagenazom (1mg/mL u PBS-u, *Thermo Fisher Scientific*, SAD), 70 min na 37°C. Nakon tri kratka pranja destilovanom vodom i 2 pranja po 5 min PBST-om, uzorci su fiksirani u rastvoru 4% PFA/PBS 20 min. Uslijedila su tri pranja po 3 min PBST-om i inkubacija u puferu za blokiranje 1 (Tabela 7), 30 min. Uzorci su zatim inkubirani 48 sati na 4°C sa primarnim antitijelom razblaženim puferom za blokiranje 1. Primarna antitijela su uklonjena ispiranjem uzoraka 4 puta po 15 min PBST-om. Inkubacija sa sekundarnim antitijelima razblaženim u puferu za blokiranje 1 se odvijala preko noći, na 4°C. Sekundarna antitela su uklonjena pranjem

uzoraka 6 puta po 10 min puferom PBST, nakon čega su uzorci spremljeni za mikroskopiju montiranjem u 1,5% agarozu sa niskom tačkom topljenja u šoljama sa staklenim dnom.

3.2.6.2. Imunohistohemijska detekcija proteina na presjecima smrznutog srca zebrice

Nakon žrtvovanja zebrica i disekcije, srca su fiksirana u 4% PFA/PBS 60 min na sobnoj temperaturi. Srca su potom isprana PBS-om i potopljena u rastvor 30% saharoza/PBS preko noći, na 4°C. Nakon toga srca su uronjena u medijum *Tissue-Tek O.C.T. (Sakura, SAD)* i smrznuta na suvom ledu. Kriotomom su pravljene presjeci tkiva debljine 10 µm, koji su prenijeti na predmetna stakla i čuvani na -20°C do imunobojenja. Imunobojenje je započeto pranjem preparata PBST-om, dva puta po 5 min. Nakon još dva pranja po 5 min vodom, uzorci su permeabilizovani u 3% rastvoru vodonik-peroksida u metanolu, 60 min na sobnoj temperaturi. Preparati su zatim oprani dva puta po 5 min vodom i dva puta po 5 min PBST-om, nakon čega su inkubirani u rastvoru za blokiranje 2 (Tabela 7), 1-3 sata na sobnoj temperaturi. Uslijedila je inkubacija sa primarnim antitijelima rastvorenim u rastvoru za blokiranje 2, preko noći na 4°C. Primarna antitijela su uklonjena ispiranjem preparata PBST-om, tri puta po 10 min. Uzorci su zatim inkubirani sa sekundarnim antitijelima razblaženim u rastvoru za blokiranje 2, 120 min na sobnoj temperaturi. Jedra su bojena DAPI-jem (4',6-diamidino-2-fenilindol, 1 ng/µL u PBS-u), 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon 4 pranja po 10 min PBST-om, montirana su pokrovna stakla pomoću hidrosolubilnog medijuma za montiranje (*Mowiol, Sigma-Aldrich, SAD*).

3.2.6.3. Bojenje metodom A.F.O.G.

Acid Fuchsin Orange G (A.F.O.G.) bojenje omogućava razlikovanje kolagena, fibrina i kardiomiocita na histološkim presjecima srca zebrice. U ovoj studiji korišćen je A.F.O.G. kit (*Biognost, Hrvatska*) za bojenje kriopresjeka srca zebrice. Nakon fiksacije u 4% formaldehidu, srca su potopljena preko noći u 30% rastvor saharoze, prebačena u Kilik medium (*Bio-Optica, Italija*) i smrznuta na suvom ledu. Kriotomom su napravljeni presjeci tkiva debljine 10 µm, prenijeti na predmetna stakla i čuvani na -20°C do bojenja. Protokol bojenja je započet inkubacijom preparata u Buansovom rastvoru 120 min na 60°C. Nakon 30 min ispiranja tekućom destilovanom vodom, na preparat je nanijeta kap fosfomolibdenske kiseline. Inkubacija je trajala 7 min na sobnoj temperaturi. Uslijedilo je ispiranje tekućom destilovanom vodom 3 min, i nanošenje kapi A.F.O.G. rastvora na preparat. Nakon 3 min inkubacije na sobnoj temperaturi, preparat je ispiran tekućom destilovanom vodom 2 min. Tkivo je dehidratirano pranjima preparata u 95% etanolu 2 min i dva puta po 2 min u 100% etanolu. Nakon pranja u ksilenu 1 min, montirana su pokrovna stakla pomoću medijuma DPX (*Sigma-Aldrich, Njemačka*).

3.2.7. Mikroskopija i obrada slika

3.2.7.1. Priprema embriona i larvi zebrice za *in vivo* mikroskopiju

Embrioni stariji od 24 sno su tretirani 0,003% rastvorom 1-fenil 2-tiouree (PTU, *Sigma Aldrich, Njemačka*) radi spriječavanja pigmentacije koja bi onemogućavala posmatranje unutrašnjih tjelesnih struktura. Za snimanje živih jedinki tokom razvića, dehorionisani embrioni i larve su anestetizirani 0,02% rastvorom trikaina u E3 medijumu, nakon čega su montirani u kapi 1,5% agaroze sa niskom tačkom topljenja u šoljama sa staklenim dnom. Oko montiranih jedinki je nasut rastvor 0,02% trikain/E3 kako bi se životinje održavale u anestetiziranom stanju tokom snimanja. Nakon mikroskopiranja, jedinke su oslobođene iz agaroze, vraćene u rastvor E3 i nastavljeno je sa njihovim uzgajanjem.

3.2.7.2. Priprema adutnih jedinki i tkiva zebrice za mikroskopiju

Adultne jedinke zebrice su nakon žrtvovanja postavljane bočno i snimane svjetlosnim ili fluorescentnim mikroskopom. Tkiva izolovana disekcijom su fiksirana u 4% PFA, isprana PBS-om i

inkubirana u 30% saharozi rastvorenoj u PBS-u preko noći na 4°C. Tkiva su potom potapana u Kilik medijum (*Bio-Optica*, Italija), smrznuta na suvom ledu i čuvana na -80°C. Kriotomom su pravljene presjeci tkiva debljine 10 µm koji su prenijeti na predmetna stakla, prosušeni i čuvani na -20°C. Pred samo snimanje na konfokalnom mikroskopu, presjeci su isprani PBS-om, obojeni bojom za jedra DAPI, i preko njih su montirana pokrovna stakla pomoću hidrosolubilnog medijuma za montiranje (*Mowiol*, *Sigma-Aldrich*, SAD).

3.2.7.3. Svjetlosna, fluorescentna i konfokalna mikroskopija

Svjetlosna mikroskopija rađena je na Stemi 508 mikroskopu opremljenom kamerom u boji *Axiocam 208* (*Zeiss*, Njemačka). Snimanje fluorescence rađeno je na mikroskopima *Nikon SMZ 25* (*Nikon*, Japan) i *Olympus BX-51* (*Olympus*, Japan). Konfokalna mikroskopija rađena je na sistemima *LSM 700* (*Zeiss*, Njemačka) i *Leica SP8* (*Leica*, Njemačka).

3.2.7.4. Obrada slika

Slike su analizirane i obrađene programima *Zen Blue* (*Zeiss*, Njemačka), *LAS X* (*Leica*, Njemačka) i *Fiji* distribucije platforme *Image J* (verzija 1.53C), uz upotrebu eksternih algoritama za spajanje snimaka i produblivanje fokusa (135–137). Optički presjeci dobijeni su na osnovu sekvence snimaka po Z-osi (dubini) generisanih konfokalnim mikroskopom *Leica SP8*, odgovarajućim pozicioniranjem ravni presjeka u okviru programu *Fiji*.

3.2.8. Kvantifikacija proliferacije kardiomiocita

Za kvantifikaciju proliferacije kardiomiocita analizirane su slike tri neuzastopna presjeka po jednom srcu. U pojasu širine 200 µm od ivice povrede, određen je ukupan broj kardiomiocita (*Mef-2*⁺) i broj kardiomiocita koji ekspresiraju marker proliferacije, *PCNA* (*Mef-2*⁺/*PCNA*⁺). Procenat proliferišućih kardiomiocita (KM) izračunat je po formuli:

$$\% \text{ proliferišućih KM} = \frac{\text{ukupan broj Mef2}^+ / \text{PCNA}^+ \text{ KM na 3 presjeka}}{\text{ukupan broj Mef2}^+ \text{ KM na 3 presjeka}} \times 100$$

3.2.9. Statistička analiza

Statistička obrada rezultata rađena je u programskom paketu *GraphPad v6.0*.

Kao statistički test za poređenje nivoa ekspresije gena na različitim stadijumima tokom razvića korišćena je jednosmjerna ANOVA analiza praćena Takijevim testom međusobnih poređenja.

Poređenja nivoa transkripata, procenata proliferacije, parametara zarastanja rana i intenziteta fluorescence među eksperimentalnim grupama, rađeno je parametrijskim dvostranim t-testom za poređenje nezavisnih uzoraka. Razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je *P*-vrijednost bila manja od 0,05. Izmjerene vrijednosti su prikazane kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija.

4. Rezultati

Karakterizacija gena i proteina familije MARP zebrice obuhvatila je:

- bioinformatičku analizu: poređenje strukture gena *MARP* i sekvenci proteina MARP zebrice, čovjeka i miša; analiza sintenije hromozoma i konstrukcija filogenetskog stabla članova familije MARP evoluciono udaljenih vrsta;
- analizu ekspresije tokom razvića: utvrđivanje razvojnog i tkivnog profila ekspresije gena *MARP* tokom razvića i u adultnim zebricama; generisanje reporterske linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* radi identifikacije tkivnih domena ekspresije *ankrd1a* sa visokom rezolucijom;
- analizu ekspresije tokom odgovora na stres (povećanu fizičku aktivnost i povredu srca): uspostavljanje i validiranje protokola forsiranog plivanja u viru, analiza tkivno zavisne promene ekspresije gena *MARP* u odgovoru na povećanu fizičku aktivnost, analiza dinamike i lokalizacije ekspresije *ankrd1a* na ćelijskom nivou u kriopovrijeđenim komorama srca;
- funkcionalnu analizu: generisanje mutanata za gene *MARP* zebrice i ispitivanje njihove uloge u razviću, doprinos *ankrd1a* procesu regeneracije povrijeđenog srca analizom proliferacije kardiomiocita i uklanjanja ožiljka kod zebrica nosilaca mutacije u *ankrd1a* genu.

4.1. Bioinformatička analiza gena i proteina familije MARP

S obzirom da je ovo prva studija članova familije MARP zebrice, na samom početku su identifikovani ortolozi gena *MARP* u genomu zebrice i izvršena je njihova analiza i poređenje proteinskih sekvenci kod evoluciono udaljenih vrsta.

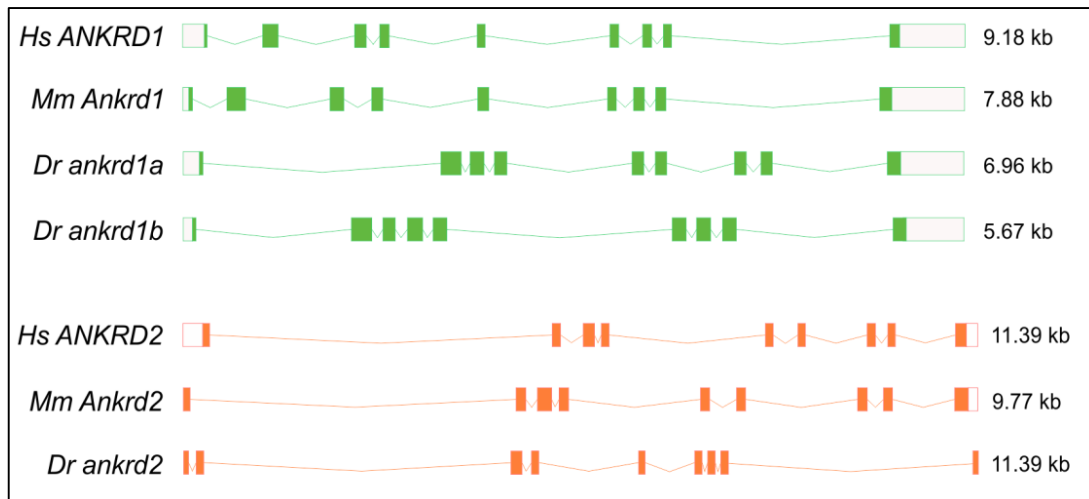
Podaci o genima i proteinima familije MARP zebrice dobijeni su iz baze podataka *Ensembl* (124). U genomu zebrice, verzija GRCz11, prisutna su tri unosa za gene familije *MARP*: *ankrd1a*, *ankrd1b* i *ankrd2*. Osnovni podaci o navedenim genima, predviđenim transkriptima i proteinima dati su u Tabeli 25. Genom zebrice sadrži dva gena ortologa sa čovječijim *ANKRD1*: *ankrd1a* i *ankrd1b*. Ova dva paraloga razlikuju se po dužini transkripta, proteinskoj sekvenci i nalaze se na različitim hromozomima: *ankrd1a* je na hromozomu 17, a *ankrd1b* je na hromozomu 12. Razlika u dužini dva predviđena transkripta gena *ankrd1a* posljedica je dužih netranslatirajućih regiona na 5' i 3' krajevima, dok se sa njih translatirani proteini razlikuju u 11 aminokiselina na samom C-terminusu. U daljim analizama korišćen je samo protein dužine 317 aminokiselina (ENSDARP0000009801.3), kao primarna predviđena izoforma. Gen *ankrd2* je jedini ortolog čovječijem *ANKRD2*. Treći član *MARP* familije, *ANKRD23* (*DARP*), nema ortologa u genomu zebrice.

Tabela 25. Podaci o genima, transkriptima i proteinima familije MARP, dobijeni iz baze podataka *Ensembl* (verzija genoma zebrice GRCz11) (124).

Gen	ID gena	Lokacija u genomu	Transkript	ID transkripta	Veličina transkripta (bp)	Veličina proteina (ak)	ID proteina
<i>ankrd1a</i>	ENSDARG 00000075263	Hromozom 17: 23,462,972	<i>ankrd1a</i> -201	ENSDART 0000011295 9.4	1673	317	ENSDARP 000000980 01.3
	ZDB-GENE-100405-1	- 23,472,265	<i>ankrd1a</i> -202	ENSDART 0000019216 8.1	927	308	ENSDARP 000001460 94.1
<i>ankrd1b</i>	ENSDARG 00000076192	Hromozom 12: 16,440,708	<i>ankrd1b</i> -201	ENSDART 0000011381 0.3	1348	283	ENSDARP 000000978 89.2
<i>ankrd2</i>	ENSDARG 00000002722	Hromozom 13: 40,729,618	<i>ankrd2</i> -201	ENSDART 0000007482 9.5	888	296	ENSDARP 000000693 15.4
	ZDB-GENE-090313-383	- 40,741,005					

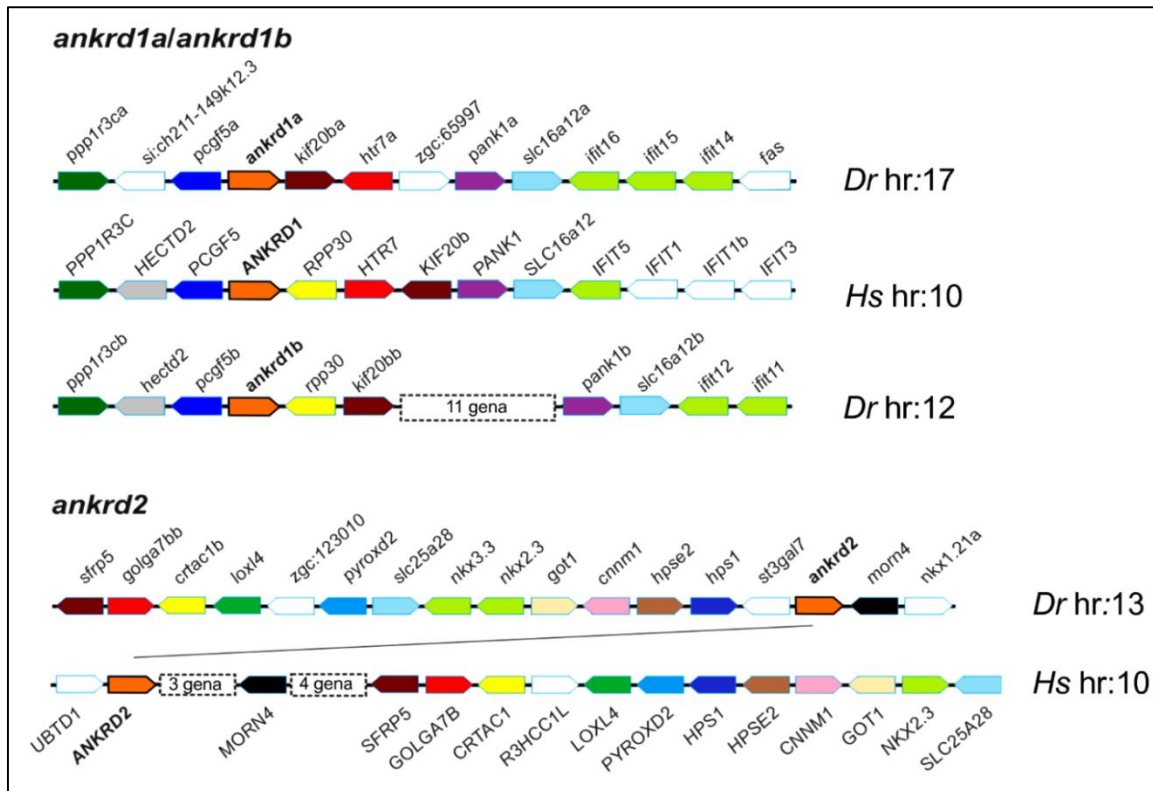
ID=identifikacioni broj unosa u bazi, bp=baznih parova, ak=aminokiselina

Strukture gena *MARP* čovjeka, miša i zebrice dobijene su iz baze podataka *Ensembl*. Svi geni posjeduju 9 egzona, mada postoje razlike u strukturi intronskih i egzonskih sekvenci između gena zebrice i sisara (Slika 15).



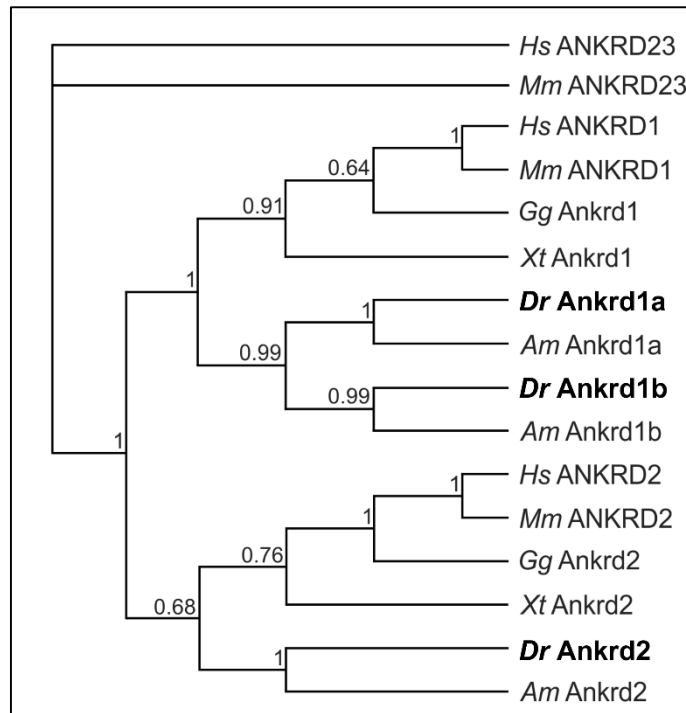
Slika 15. Uporedni prikaz egzon-intron strukture gena *MARP* čovjeka (*Hs*), miša (*Mm*) i zebrice (*Dr*). Brojevi označavaju dužinu gena. Egzoni su predstavljeni pravougaonima, a introni linijama. kb=kilobaza.

Poređenje hromozomskih lokusa u kojima se nalaze *ankrd1a* i *ankrd1b* zebrice i čovječiji *ANKRD1* otkriva podudaranje relativnih pozicija ortologih gena kod obje vrste (Slika 14). Okolina *ankrd2* lokusa sadrži ortologe prisutne i u okolini čovječijeg gena *ANKRD2*, ali je tokom evolucije došlo do rearanžmana njihovih pozicija (Slika 16).



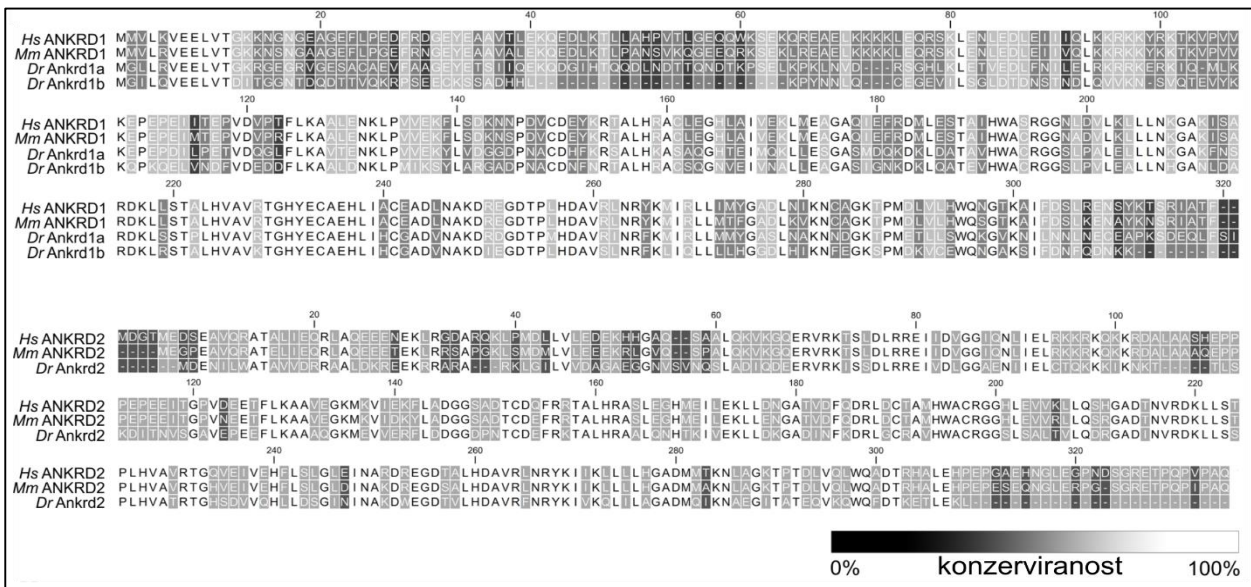
Slika 16. Analiza sintenije hromozoma u regionu gena *MARP* zebrice (*Dr*) i čovjeka (*Hs*). Ortolozi su predstavljeni istom bojom. hr=hromozom

Na osnovu poređenja sekvenci proteina članova familije MARP evoluciono udaljenih vrsta, algoritmom *PhyML* konstruisano je filogenetsko stablo (Slika 17) (132). Homolozi ANKRD1 i ANKRD2 segregiraju u zasebne grupe. Protein Ankrd1b, prisutan samo kod košljoriba, segregira u zasebnu grupu blisku sa proteinom Ankrd1a.



Slika 17. Filogenetsko stablo članova familije MARP. Pouzdanost čvorova izražena je brojevima na granama stabla. Oznake vrsta: *Hs*=*Homo sapiens* (čovjek), *Mm*=*Mus musculus* (Miš), *Gg*=*Gallus gallus* (kokoška), *Xt*=*Xenopus tropicalis* (žaba), *Dr*=*Danio rerio* (zebrica), *Am*=*Astyanax mexicanus* (meksička slijepa riba).

Poravnanja aminokiselinskih sekvenci članova familije MARP čovjeka, miša i zebrice, dobijena su pomoću algoritma *Clustal Omega* (Slika 18) (126). Sekvence se najviše podudaraju u regionima ankirinskih ponovaka, koji su karakteristični za sve članove familije MARP.



Slika 18. Poravnanja aminokiselinskih sekvenci ortologa MARP čovjeka (*Hs*=*Homo sapiens*), miša (*Mm*=*Mus musculus*) i zebrice (*Dr*=*Danio rerio*) generisano algoritmom *Clustal Omega*. Ankirinski ponovci su na pozicijama 148-280 u poravnanju ANKRD1 ortologa i 121-283 u poravnanju ANKRD2 ortologa.

Sličnost i identičnost aminokiselinskih sekvenci ortologa MARP izračunate su pomoću algoritma *MatGAT* (127). Identičnost aminokiselinskih sekvenci na osnovu međusobnih poređenja ortologa zebrice i sisara iznosi od 43,9% do 54,2% na nivou cjelokupnih sekvenci (Tabela 26), dok je u regionima ankirinskih ponovaka od 65,4% do 67,2% (Tabela 27). Kada je u pitanju sličnost aminokiselinskih sekvenci, vrijednosti se kreću od 61,1% do 71,8% za cjelokupne sekvence (Tabela 26) i 79,7% do 85,1% u regionima ankirinskih ponovaka (Tabela 27).

Tabela 26. Sličnost (zelena polja) i identičnost (plava polja) aminokiselinskih sekvenci ortologa MARP. *Dr*=*Danio rerio* (zebrica), *Hs*=*Homo sapiens* (čovjek), *Mm*=*Mus musculus* (miš).

%	<i>Dr ankrd1a</i>	<i>Dr ankrd1b</i>	<i>Hs ANKRD1</i>	<i>Mm Ankrd1</i>
<i>Dr ankrd1a</i>		45,1	54,2	53,2
<i>Dr ankrd1b</i>	64,0		44,8	43,9
<i>Hs ANKRD1</i>	71,8	62,7		90,3
<i>Mm Ankrd1</i>	71,2	61,1	95,0	
%	<i>Dr ankrd2</i>	<i>Hs ANKRD2</i>	<i>Mm Ankrd2</i>	
<i>Dr ankrd2</i>		46,7	46,5	
<i>Hs ANKRD2</i>	64,0		88,0	
<i>Mm Ankrd2</i>	64,6	92,5		

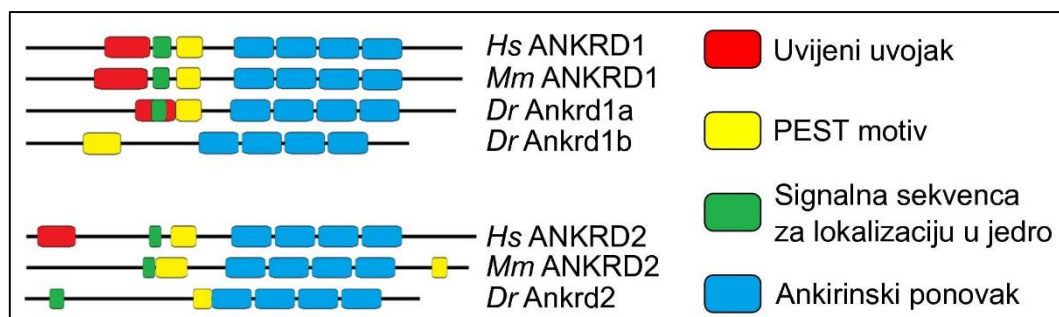
Dr=*Danio rerio* (zebrica), *Hs*=*Homo sapiens* (čovjek), *Mm*=*Mus musculus* (miš).

Tabela 27. Sličnost (zelena polja) i identičnost (plava polja) aminokiselinskih sekvenci ortologa MARP u regionima ankirinskih ponovaka.

%	<i>Dr ankrd1a</i>	<i>Dr ankrd1b</i>	<i>Hs ANKRD1</i>	<i>Mm Ankrd1</i>
<i>Dr ankrd1a</i>		68,7	67,2	65,7
<i>Dr ankrd1b</i>	83,6		66,2	65,4
<i>Hs ANKRD1</i>	85,1	82,0		94,7
<i>Mm Ankrd1</i>	83,6	79,7	95,0	
%	<i>Dr ankrd2</i>	<i>Hs ANKRD2</i>	<i>Mm Ankrd2</i>	
<i>Dr ankrd2</i>		64,4	64,4	
<i>Hs ANKRD2</i>	80,6		93,1	
<i>Mm Ankrd2</i>	81,9	98,8		

Dr=*Danio rerio* (zebrica), *Hs*=*Homo sapiens* (čovjek), *Mm*=*Mus musculus* (miš).

Kao i kod sisara, u proteinima familije MARP zebrice predviđeno je postojanje nekoliko motiva i domena: motiv uvijenog uvojka, sekvence PEST i signalne sekvence za lokalizaciju u jedro (NLS). Struktura proteina sa predviđenim proteinskim motivima u homolozima MARP šematski je prikazana na Slici 19. Pozicije navedenih motiva i domena u aminokiselinskoj sekvenci proteina MARP zebrice date su u Tabeli 28.



Slika 19. Šematski prikaz položaja motiva i domena ortologa MARP. *Dr*=*Danio rerio* (zebrica), *Hs*=*Homo sapiens* (čovjek), *Mm*=*Mus musculus* (miš).

Tabela 28. Podaci o predviđenim motivima i domenima u proteinima MARP zebrice.

Protein	Motiv/Domen	Pozicija (ak)	Izvor
Ankrd1a	Uvijeni uvojak	77-105	<i>SMART</i>
	NLS	91-99	<i>NLStradamus</i>
	PEST	104-122	<i>ePESTfind</i>
	Ankirinski ponovci	144-177; 181-210; 214-243; 247-276	<i>SMART</i>
Ankrd1b	PEST	41-70	<i>ePESTfind</i>
	Ankirinski ponovci	124-153; 157-186; 190-219; 223-252	<i>SMART</i>
Ankrd2	NLS	20-31	<i>NLStradamus</i>
	PEST	128-143	<i>ePESTfind</i>
	Ankirinski ponovci	108-137; 141-170; 174-203; 207-236; 240-269	<i>SMART</i>

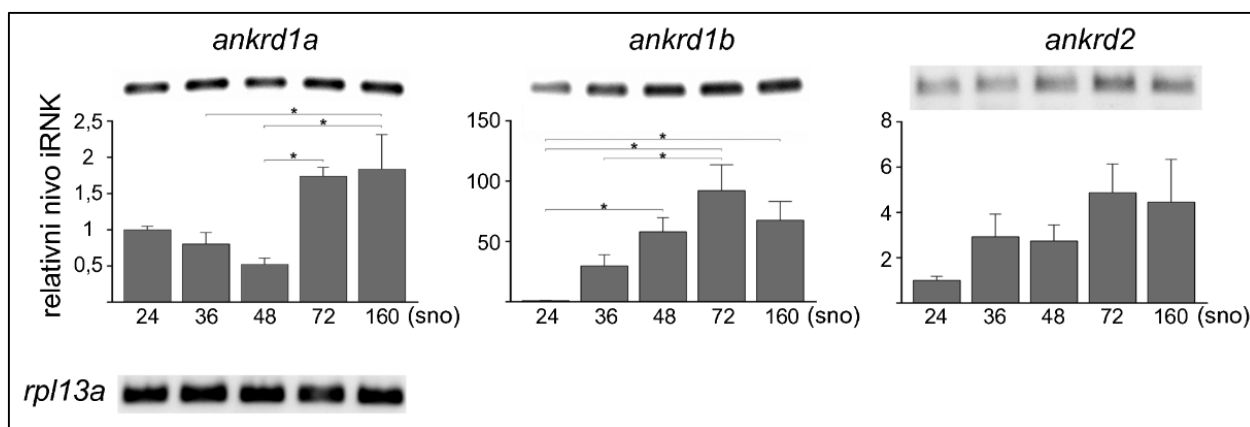
NLS=signalna sekvenca za lokalizaciju u jedro, ak=aminokiselina.

4.2. Ekspresija gena *MARP* zebrice

Ekspresija gena *MARP* sisara u srcu i skeletnim mišićima tokom razvića i kod adultnih jedinki je opisana u literaturi (pregled dat u reviji Kojic i saradnici (21)). U ovoj studiji je, kvantifikacijom i određivanjem lokalizacije transkripata, po prvi put opisan profil ekspresije gena *MARP* zebrice tokom razvića i na stadijumu adulta.

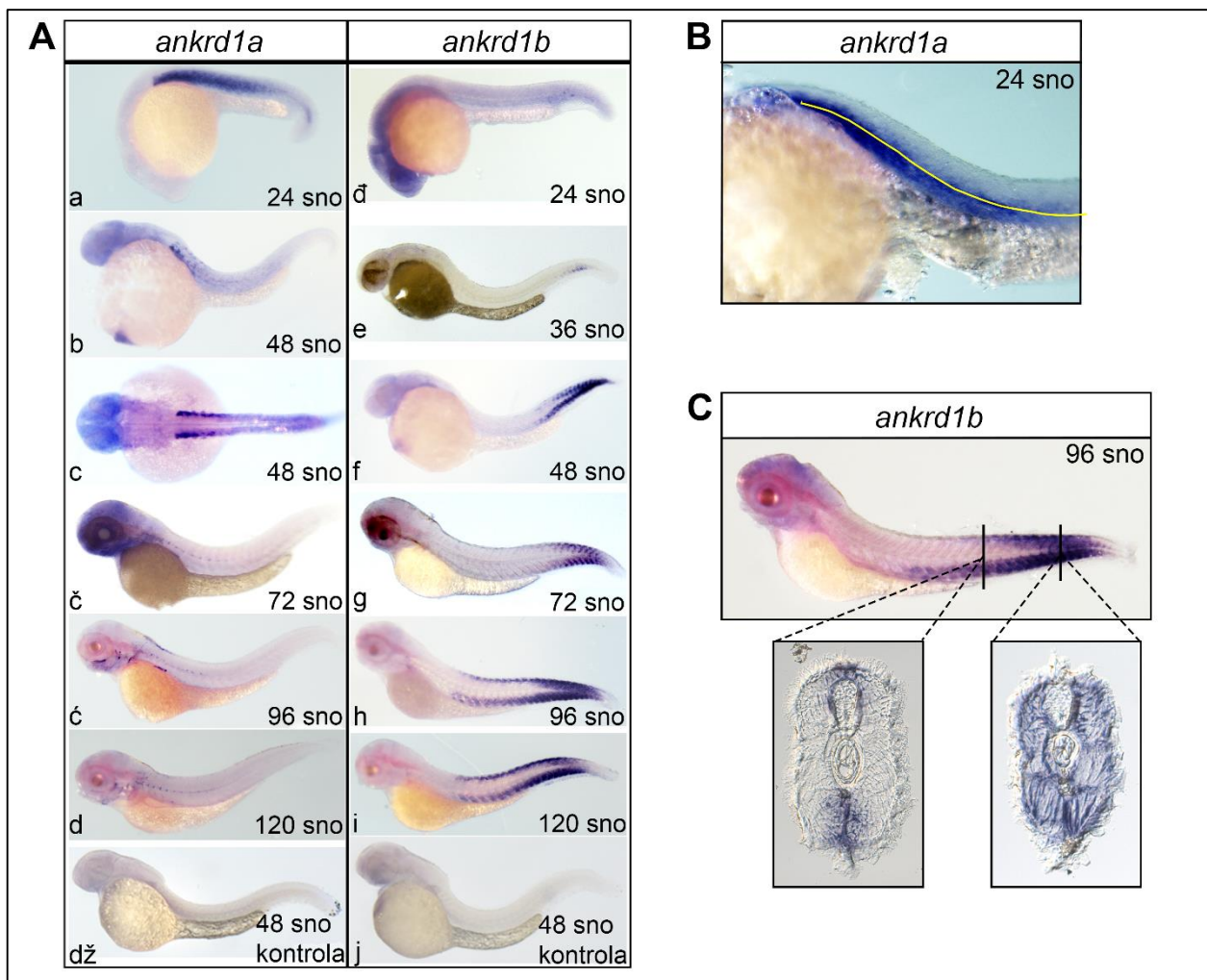
4.2.1. Ekspresija gena *MARP* tokom razvića zebrice

Kako bi stekli uvid u potencijalnu ulogu članova familije MARP u razviću zebrice, ispitivan je razvojni i tkivni profil njihove ekspresije tokom prvih 7 dana od začeca. Razvojni profil ekspresije gena *MARP* tokom razvića analiziran je metodom RT-qPCR na stadijumima od 24 do 168 sno (Slika 20). U slučaju gena *ankrd1a* i *ankrd1b*, zabilježen je porast ekspresije u toku razvića. Gen *ankrd2* je nisko eksprimiran tokom razvića i nisu detektovane statistički značajne promjene u nivou ekspresije na analiziranim stadijumima.



Slika 20. Relativna kvantifikacija količine transkripata *MARP* tokom razvića zebrice. Vrijednosti su normalizovane na količinu transkripta na stadijumu od 24 sno. Kao referentni transkript koršćen je *rpl13a*. Trake na agaroznom gelu, prikazane iznad grafika, dobijene su elektroforezom iste zapremine produkata reakcije RT-qPCR. Statistički značajna razlika među grupama označena je zvijezdicom (*). sno=sati nakon oplodjenja.

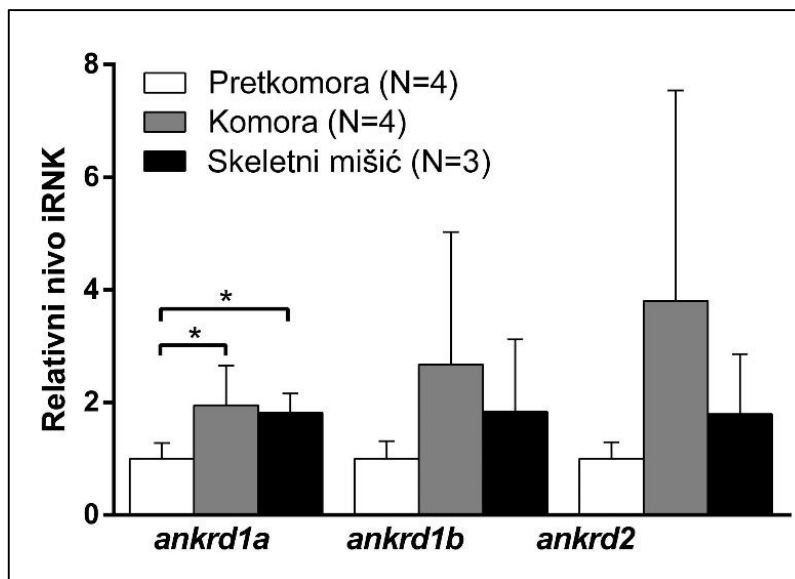
Metodom *in situ* RNK hibridizacije na embrionima i larvama utvrđena je lokalizacija transkripata gena *MARP* tokom razvića (Slika 21). Transkript *ankrd1a* je u embrionima starim 24 sno prisutan u somitima trupa, najvjerojatnije u miotomu (Slika 21 A, panel a), duž horizontalnog mioseptuma (Slika 21 B). U embrionima 48 sno, transkript je i dalje vidljiv u regionu trupa (Slika 21 A, panel b). Pogled sa dorzalne strane na ovom stadijumu otkriva poziciju transkripta bilateralno, pri površini tijela (Slika 21 A, panel c). Nakon 72 sata od oplodjenja, transkript je prisutan i u mišićima glave (Slika 21 A, paneli č-d). Pojava transkripta *ankrd1b* uočena je na stadijumu 36 sno, u mišićima pri kraju repnog regiona (Slika 21 A, panel e). U kasnijim fazama razvića, transkript *ankrd1b* je detektovan i u rostralnom dijelu repnih somita (Slika 21 A, paneli f-i). Lokalizacija transkripta *ankrd1b* nije bila uniformna; u somitima pozicioniranim rostralnije transkript zauzima medijalnu zonu ventralno i dorzalno, dok je u krajnjem repnom regionu prisutan u cjelokupnoj mišićnoj masi (Slika 21 C). *In situ* RNK hibridizacijom nije detektovan transkript *ankrd2*.



Slika 21. Detekcija transkripata gena *MARP* metodom *in situ* RNK hibridizacije na embrionima i larvama sa RNK probama obilježenim digoksinom. (A) *In situ* hibridizacija na embrionima i larvama u toku prvih 5 dana razvića sa RNK probama specifičnim za transkripte *ankrd1a* (a-d) i *ankrd1b* (đ-i). Nije detektovan signal nakon hibridizacija sa kontrolnim (eng. *sense*) probama za transkripte *ankrd1a* (dž) i *ankrd1b* (j). (B) Uvećani trupni region embriona 24 sno nakon hibridizacije sa probom specifičnom za *ankrd1a*. Žutom linijom je označena pozicija horizontalnog mioseptuma. (C) Larva 96 sno nakon hibridizacije sa probom specifičnom za *ankrd1b* i poprečni presjeci kroz repni region na obilježenim pozicijama. sno=sati nakon oplodjenja.

4.2.2. Ekspresija gena *MARP* u srcu i skeletnim mišićima adultnih jedinki zebrice

Ekspresija gena *MARP* kvantifikovana je u srcu (pretkomori i komori) i skeletnim mišićima adulta zebrice metodom RT-qPCR (Slika 22). Ekspresija *ankrd1a* statistički je značajno viša u srčanoj komori ($1,95 \pm 0,71$, $P=0,047$) i skeletnim mišićima ($1,82 \pm 0,34$, $P=0,016$) u odnosu na pretkomoru srca ($1,00 \pm 0,28$). U pretkomori, komori i skeletnim mišićima nije utvrđena statistički značajna razlika u količini transkripta *ankrd1b* ($1,00 \pm 0,32$; $2,68 \pm 2,35$; $1,84 \pm 1,28$, redom) i *ankrd2* ($1,00 \pm 0,29$; $3,80 \pm 3,74$; $1,79 \pm 1,07$, redom).



Slika 22. Poređenje nivoa transkripata gena *MARP* u srcu i skeletnim mišićima zebrice. Rezultati su normirani prema nivou ekspresije u pretkomori kome je arbitrarno dodeljena vrednost 1. Kao referentni transkript korišćen je *rpl13a*. N=broj bioloških replikata. * $P < 0.05$

4.3. Praćenje dinamike i lokalizacije ekspresije *ankrd1a* u transgennoj liniji zebrice *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*

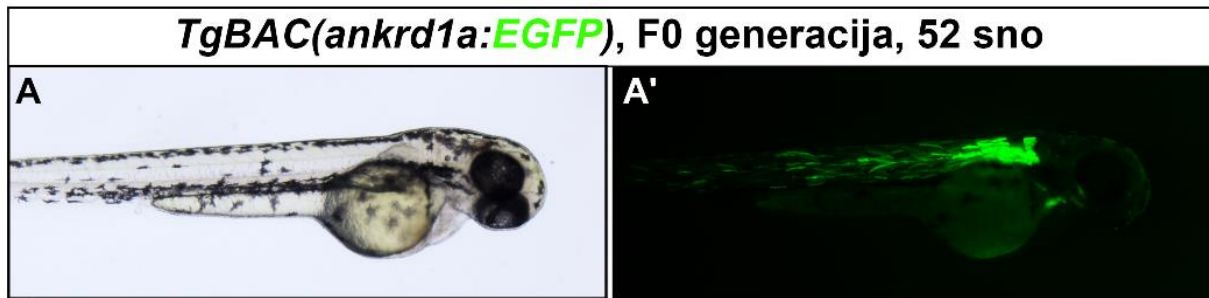
Na osnovu prethodno utvrđenih ekspresionih profila gena *MARP* zebrice, veće sličnosti aminokiselinskih sekvenci *Ankrd1a* i njegovih sisarskih homologa, u odnosu na *Ankrd1b*, kao i preliminarnih podataka koji su ukazivali na izmijenjenu ekspresiju *ankrd1a* u srcu izloženom stresu, posebna pažnja posvećena je detaljnijoj karakterizaciji ekspresije i funkcije gena *ankrd1a* zebrice. Radi postizanja veće rezolucije u praćenju ćelija koje ekspimiraju *ankrd1a*, generisana je transgena linija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* u kojoj je ekspresija fluorescentnog reportera EGFP pod kontrolom promotora *ankrd1a*. Ova transgena linija je omogućila indirektan uvid u dinamiku i lokalizaciju ekspresije *ankrd1a* kako u živim embrijima i larvama, tako i u fiksiranim uzorcima.

4.3.1. Ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* tokom razvića zebrice

Za generisanje linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* korišćen je sintetisani BAC konstrukt koji sadrži segment genoma zebrice od približno 83 kb sa 5' i 91 kb sa 3' strane gena *ankrd1a*. Nakon start kodona gena *ankrd1a*, umetnuta je sekvenca koja kodira reporter EGFP. Uslijed prisustva terminalnih ponovaka Tol2 transpozona u sekvenci BAC konstrukta, njegovo koinjektiranje sa iRNK koja kodira transpozazu Tol2 rezultiralo je ugrađivanjem BAC konstrukta u genom zebrice.

Nakon 52 sata od koinjektiranja BAC konstrukta i iRNK za Tol2 transpozazu, u 60% jedinki detektovan je EGFP signal (Slika 23). Među injektiranim jedinkama su primjećene varijacije u

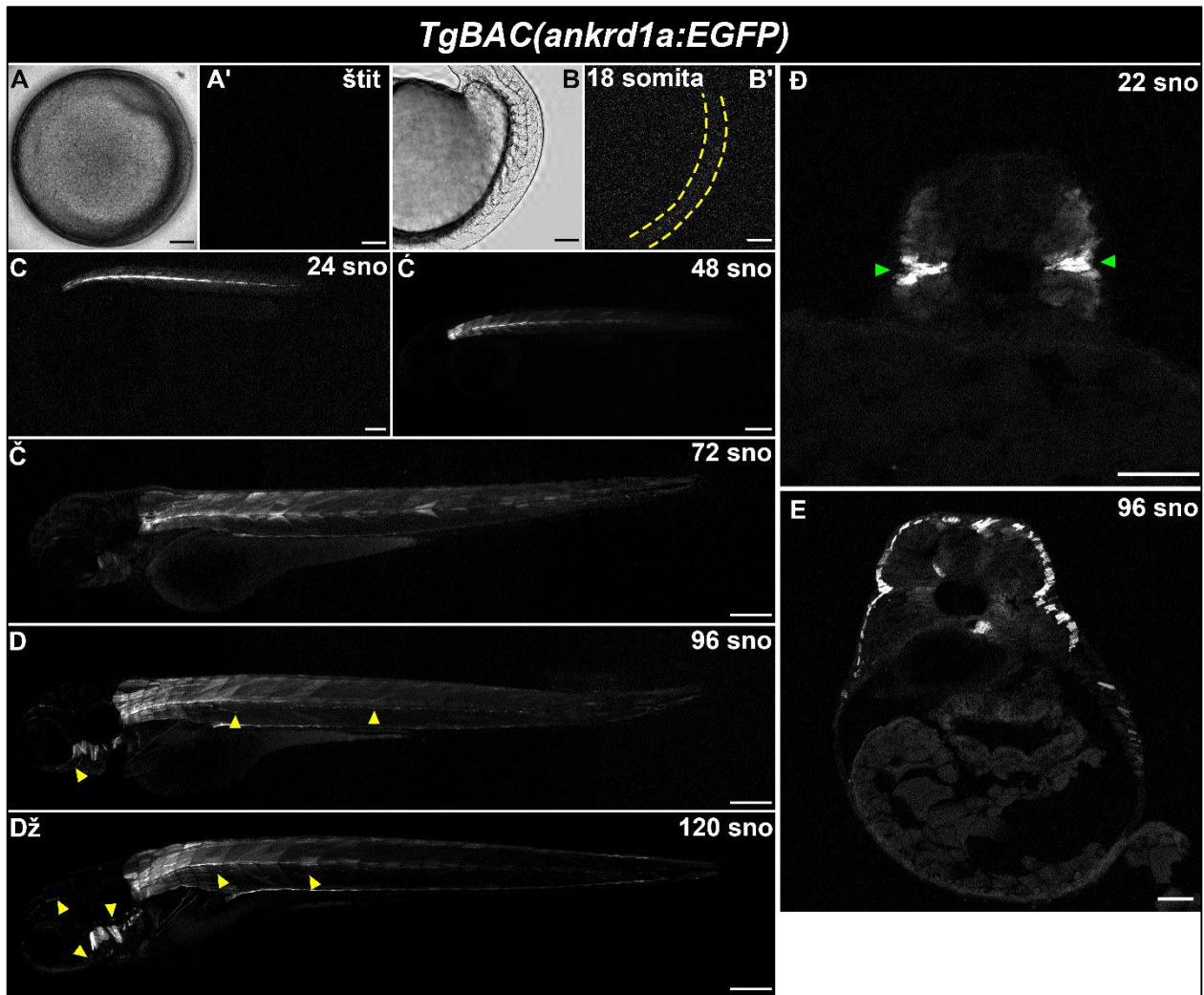
intenzitetu signala, odnosno u broju ćelija u kojima je ekspimiran EGFP. Za dalji uzgoj do adultnog stadijuma, vizuelnom inspekcijom odabrano je 20 jedinki sa najvećim brojem EGFP⁺ ćelija.



Slika 23. Embrion transgene zebrice 52 sata nakon koinjektiranja konstrukta *BAC(ankrd1a:EGFP)* i *tol2* iRNK. Prikazane slike su svjetlosna mikrografija (A) i fluorescencija u zelenom spektru (A') iste jedinke. sno=sati nakon oplodjenja.

Od odabranih jedinki, jedna je davala potomstvo sa detektabilnim EGFP signalom, ukazujući na genomsku integraciju konstrukta *BAC(ankrd1a:EGFP)* u ćelije germinativne linije ove jedinke F0 generacije. Analizom ekspresije transgena u F1 generaciji, utvrđeno je da sve jedinke pokazuju istu lokalizaciju ekspresije transgena, dok su varijacije u intenzitetu signala bile neznatne. Daljim ukrštanjem odabrane F1 jedinke sa jedinkama *WT*, uspostavljena je transgena linija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*.

Embrioni i larve linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* snimani su konfokalnim mikroskopom tokom prvih 5 dana razvika i praćena je ekspresija transgena u skeletnim mišićima i srcu. Embrioni na stadijumu štita nisu ekspimirali transgen (Slika 24 A i A'). Slab EGFP signal je detektovan na stadijumu od 18 somita, u mišićima trupa (Slika 24 B i B'). Od 24 do 72 sno, ćelije u kojima je signal vidljiv su postavljene ventralno i dorzalno od središnje linije embriona (Slika 24 C-E). Nakon 72 sno EGFP⁺ ćelije zauzimaju perifernu poziciju u somitima i leže paralelno sa aksijalnom osom embriona (Slika 24 D i Dž). Fluorescentni signal je takođe detektovan i u mišićima glave (Slika 24 D i Dž). Pored mišićnih ćelija, *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* je ekspimiran i u interneuromastima lateralnog sistema glave i trupa (Slika 24 D i Dž, žute strelice). Na popriječnom presjeku embriona starog 22 sno EGFP signal je vidljiv u regionu horizontalnog mioseptuma, uz notohordu i lateralno do površine embriona (Slika 24 Đ). Kod larvi starih 96 sno, popriječni presjek otkriva prisustvo EGFP u površinskom sloju mišićnih ćelija, lateralno i dorzalno (Slika 24 E).

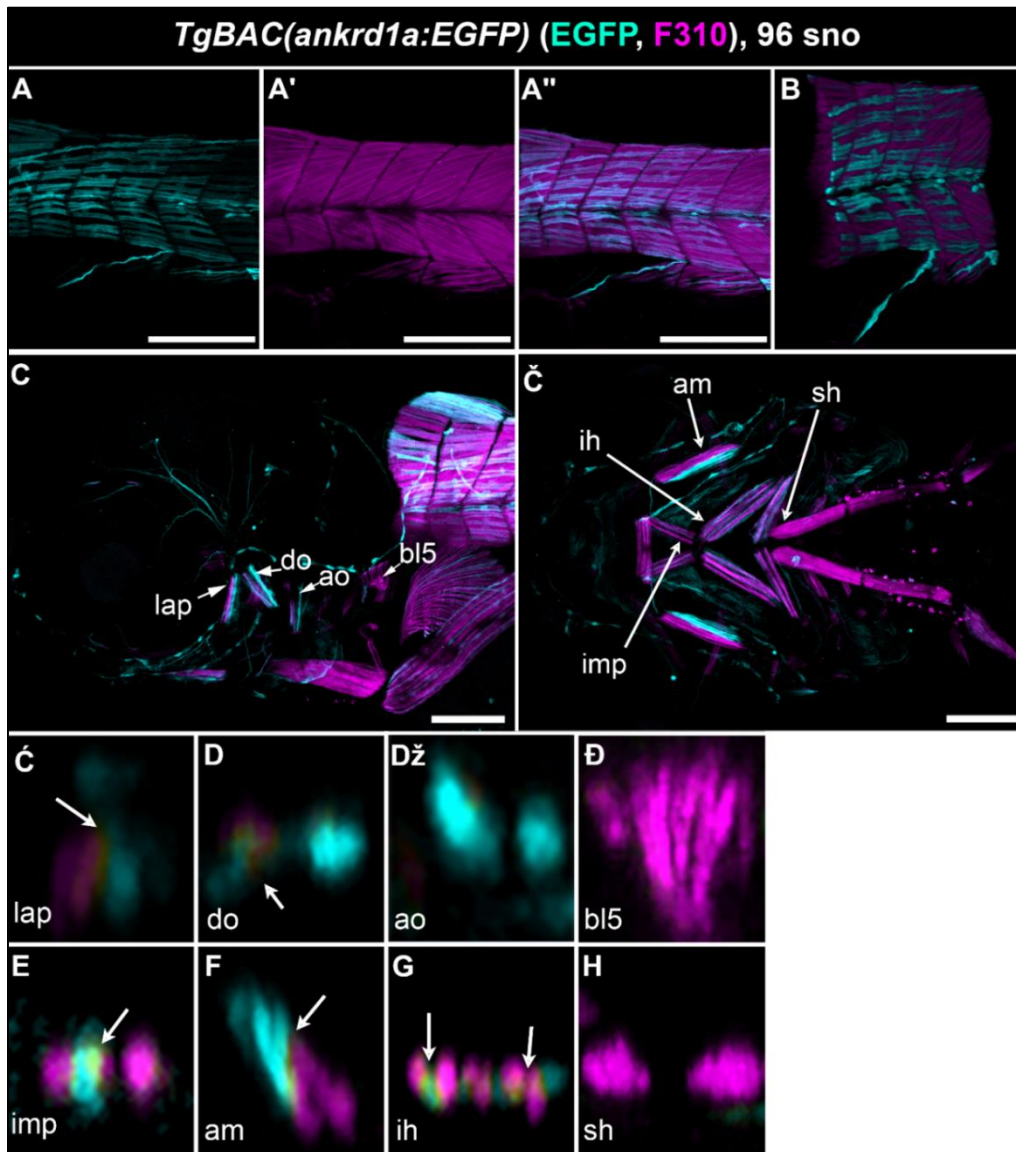


Slika 24. Ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* tokom razvića zebrice. (A-Dž) Lateralni snimci embriona i larvi od stadijuma štita (6 sno) do 120 sno. Žutim isprekidanim linijama na panelu B' je oivičen region ekspresije EGFP na stadijumu razvića od 18 somita. Žute strelice na panelima D i Dž pokazuju na ćelije interneuromasta glave i trupa. (Đ) Popriječni presjek trupa embriona 22 sno, u nivou žumancetne kese. Zelene strelice pokazuju na EGFP⁺ ćelije u horizontalnom mioseptumu i na površini embriona. (E) Popriječni presjek trupa larve 96 sno u nivou žumancetne kese. Razmjernik je 100 μ m za A-B', 200 μ m za C-Dž, 50 μ m za Đ i E. sno=sati nakon oplodjenja.

U cilju identifikacije tipa mišićnih ćelija koje eksprimiraju transgen, larve 96 sno imunohistohemijski su bojene sa anti-EGFP antitijelom u kombinaciji sa F310 (specifično za laki lanac miozina) ili MF20 (specifično za teški lanac miozina) antitijelima. F310 antitijelo boji brza mišićna vlakna zebrice, dok MF20 neselektivno boji i brza i spora mišićna vlakna. Rezultati imunohistohemijske analize korišćenjem F310 i anti-GFP antitijela prikazani su na Slici 25. EGFP⁺ ćelije pozicionirane su u jednom sloju, paralelno sa aksijalnom osom larve (Slika 25 A). Ispod ovog sloja vidljiva su brza mišićna vlakna obojena F310 antitijelom, koja se pružaju pod karakterističnim uglom u odnosu na aksijalnu osu larve (Slika 25 A'). Trodimenzionalna rekonstrukcija dijela trupa dodatno ilustruje opisani prostorni raspored obilježenih mišićnih vlakana (Slika 25 B).

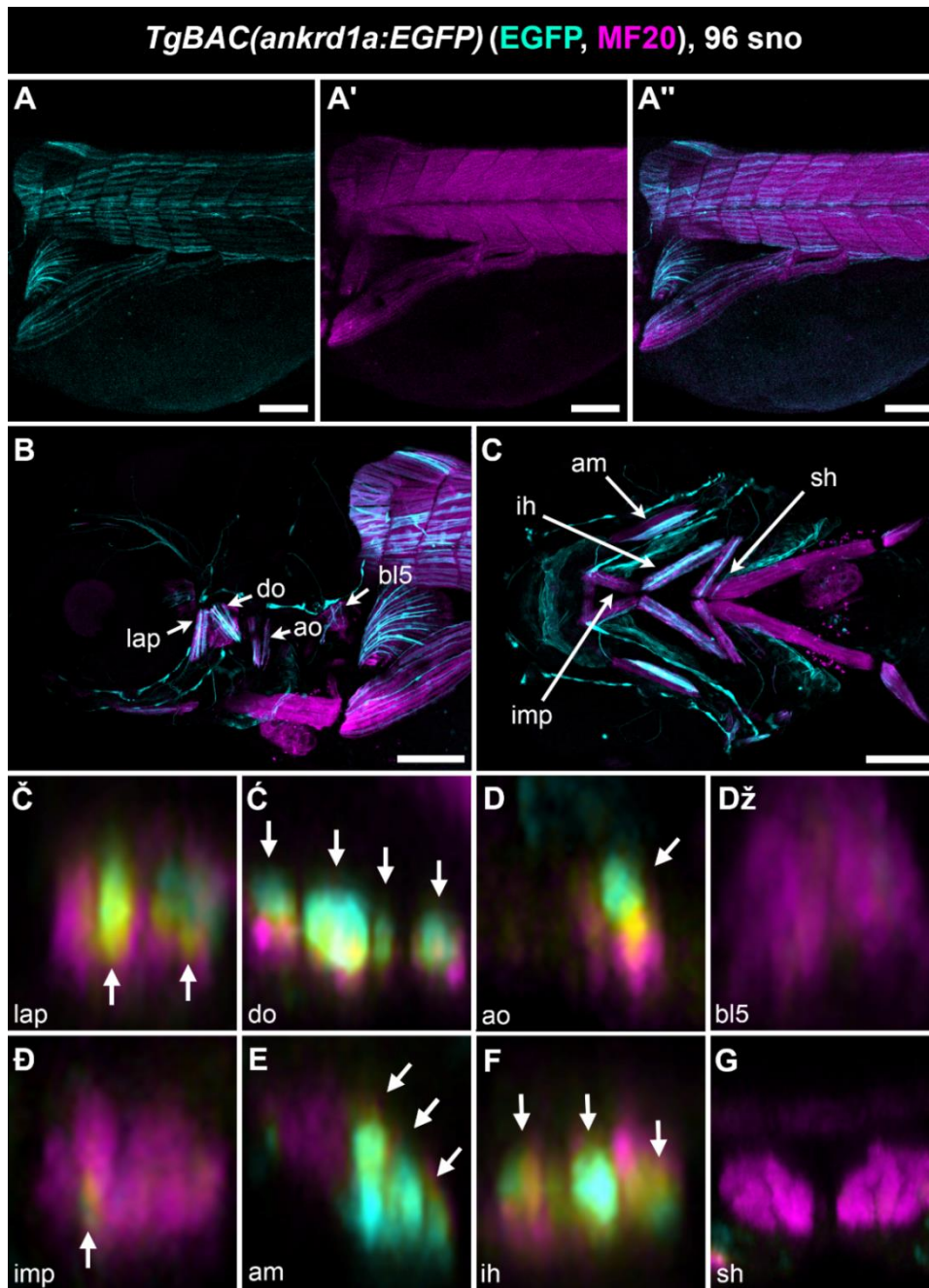
TgBAC(ankrd1a:EGFP) eksprimiran je u mišićima glave (Slika 25 C i Č), kako u vlaknima mišića mješovitog sastava (*adductor mandibulae*, *dilator operculi*, *interhyoideus*, *intermandibularis posterior*, *levator arcus palatini*), tako i u mišićima izgrađenim najvećim dijelom od sporih vlakana (*adductor operculi*). U mišićima glave, izgrađenim od isključivo brzih vlakana (*levator arcus*

branchialis 5, sternohyoideus) EGFP nije detektovan. Analiza optičkih presjeka ovih mišića ukazuje da EGFP⁺ i F310⁺ vlakna čine dvije prostorno odvojene grupe (Slika 25 Ć-H). Uske zone preklapanja signala detektovane su samo duž kontakta mišićnih vlakana različitog tipa (Slika 23, Ć-H, bijele strjelice). Mišići glave identifikovani su po uzoru na publikaciju Hernandez i saradnika (57).



Slika 25. Konfokalni snimci dijela trupa i glave larvi linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* 96 sno imunobojenih sa anti-EGFP (cijan) i F310 (magenta) antitijelima. (A-A'') EGFP⁺ ćelije u površinskom sloju trupa i F310⁺ vlakna ispod. (B) 3D rekonstrukcija. (C i Č) Glaveni region snimljen lateralno i ventralno, sa naznačenim mišićima i pozicijama optičkih presjeka (strelice). lap=*levator arcus palatini*, do=*dilator operculi*, ao=*adductor operculi*, bl5=*levator arcus branchialis 5*, imp=*intermandibularis posterior*, am=*adductor mandibulae*, ih=*interhyoideus*, sh=*sternohyoideus*. (Ć-H) Optički presjeci mišića prikazanih na panelima C i Č, strelice pokazuju na region preklapanja signala (žuto) porijeklom od bojenja anti-EGFP i F310 antitijelima. Razmjernik je 100 μm. sno=sati nakon oplodjenja.

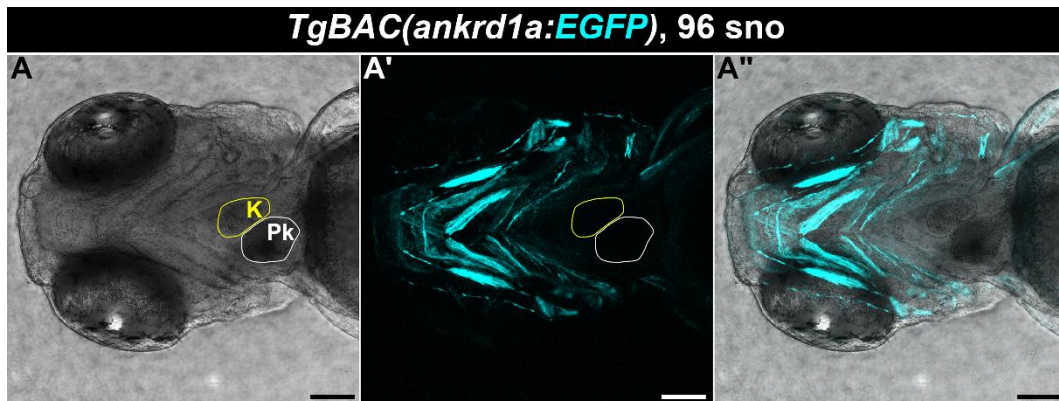
Dodatna potvrda da je EGFP eksprimiran u mišićnim ćelijama dobijena je bojenjem larvi antitijelom MF20, koje obilježava sva mišićna vlakna (Slika 26). U anti-EGFP/MF20 dvojno obilježenim larvama, jasno je vidljivo preklapanje signala.



Slika 26. Konfokalni snimci larvi 96 sno linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* imunobojenih sa anti-EGFP (cijan) i MF20 (magenta) antitijelima. (A-A'') Region trupa sa EGFP⁺ vlaknima u površinskom sloju, dok je MF20 antitijelo obojilo sva vlakna. (B i C) Lateralni i ventralni snimak glave. Strelice pokazuju mjesta optičkih presjeka pojedinih mišića. lap=*levator arcus palatini*, do=*dilator operculi*, ao=*adductor operculi*, bl5=*levator arcus branchialis 5*, imp=*intermandibularis posterior*, am=*adductor mandibulae*, ih=*interhyoideus*, sh=*sternohyoideus*. (Č-G) Optički presjeci mišića prikazanih na panelima B i C. Regioni preklapanja signala (žuto) označeni su strelicama. Razmjernik je 100 μ m. sno=sati nakon oplodjenja.

Na osnovu rezultata dvojnih bojenja zaključeno je da je *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* eksprimiran u sporim mišićnim vlaknima trupa i glave.

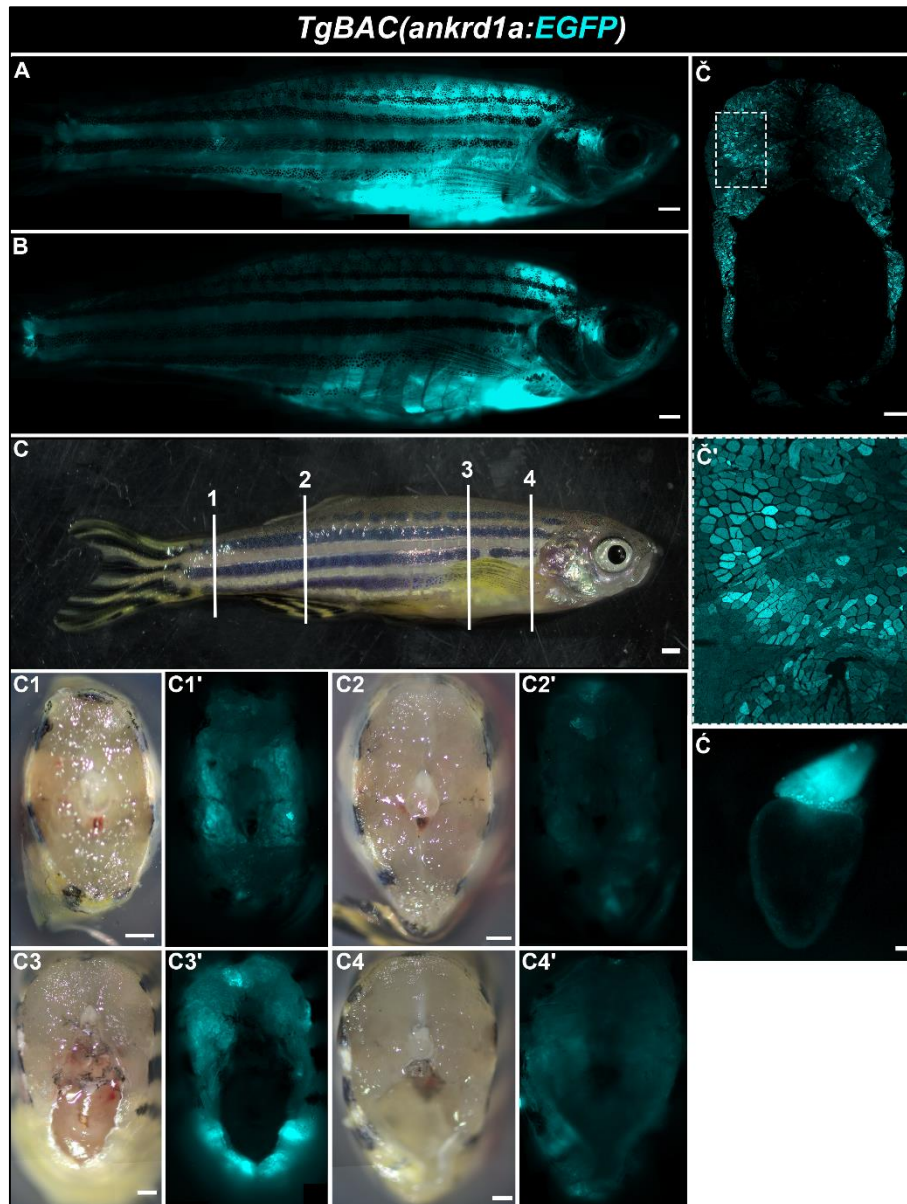
U toku prvih 5 dana razvića, u srcima *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* zebrića nije detektovan EGFP signal iznad nivoa šuma (Slika 27), na osnovu čega je zaključeno da se transgen ne eksprimira u srcu u ranim fazama razvića zebriće.



Slika 27. Konfokalni snimak glave larve 96 sno sa ventralne strane. Komora (K, žuto) i pretkomora (Pk, bijelo) oivičene su linijama. Paneli prikazuju svjetlosnu mikrografiju (A), signal porijeklom od EGFP-a (A') i preklapljene slike (A''). Razmjernik je 100 μ m. sno=sati nakon oplođenja.

4.3.2. Ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* u skeletnim mišićima i srcu adultnih jedinki zebriće

U adultnim jedinkama zebriće, snimanim fluorescentnim mikroskopom, ekspresija transgena vidljiva je u mišićima glave, trupa i repa. Među analiziranim jedinkama (4 mužjaka i 5 ženki) uočene su manje razlike u intenzitetu signala, nezavisno od pola. Reprezentativni primjerci mužjaka i ženki prikazani su na Slici 28. Na popriječnim presjecima trupa u više nivoa (Slika 28 C), EGFP signal detektovan je u mišićnim vlaknima. Za razliku od ranijih razvojnih stadijuma, ekspresija *ankrd1a* u mišićima adulta nije ograničena na spora vlakna, već je detektovana i u brzim vlaknima koja čine veći dio mišićne mase zebriće (Slika 28 C1-Č). Na konfokalnom snimku popriječnog presjeka trupa vidljiv je mozaični raspored EGFP⁺ vlakana (Slika 28 Č i Č'). Intenzitet signala je varijabilan i po uzdužnoj osi zebriće: najveći je u krajnjem repnom regionu i u trupu neposredno iza glave (Slika 28 C-C4'). EGFP signal niskog intenziteta detektovan je i u komori srca (Slika 26 Ć), dok je nivo signala u pretkomori izrazito nizak. Intenzivan signal u predjelu odvodnog trakta posljedica je autofluorescence vlakana kolagena.



Slika 28. Adultne jedinke muškog (A) i ženskog (B) pola linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*. EGFP signal je najintenzivniji u rostralnom regionu trupa. (C) Adult linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* sa označenim pozicijama presjeka prikazanih na svjetlosnim mikrografijama (C1-C4) i snimcima fluorescencije (C1'-C4'). (Č) Konfokalni snimak popriječnog presjeka adultne jedinke u nivou trupa. (Č') Uvećan segment sa panela Č. (Ć) Snimak fluorescencije srca adulta linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*. Razmjernik je 1mm za A-C4', 500 μm za Č i 100 μm za Ć.

4.4. Ekspresija gena *MARP* zebreice u uslovima povećane fizičke aktivnosti

Kontraksije skeletnih mišića visokog intenziteta dovode do povećane ekspresije *ANKRD1* i *ANKRD2* čovjeka i pacova (24–26). Kako bi analizirali ekspresioni odgovor ortologa *MARP* zebreice, povećana fizička aktivnost je modelovana pomoću protokola forsiranog plivanja u viru, nakon kojeg je analiziran nivo ekspresije gena *MARP* u skeletnim mišićima i srcu.

4.4.1. Uticaj forsiranog plivanja u viru na ekspresiju gena u skeletnim mišićima i srcu

Ovo je prva studija u kojoj je korišćen opisani protokol forsiranog plivanja u viru za modelovanje povećane fizičke aktivnosti. Kako bi dokazali aktivaciju mišića nakon njegove primjene, uporedili smo ekspresioni odgovor sa onim kod drugih pristupa modelovanju fizičke aktivnosti mišića, kao što je plivanje u tunelu. Na osnovu objavljenih studija, izdvojeni su geni zebrice, psa i čovjeka čija se ekspresija u mišićima značajno mijenja nakon povećane fizičke aktivnosti (111,138–143). Ekspresija ortologa ovih gena analizirana je kod zebrice podvrgnutih protokolu forsiranog plivanja u viru. Relativne vrijednosti ekspresije analiziranih gena u srcu i skeletnim mišićima, kao i biološki procesi u kojima učestvuju, prikazani su u Tabeli 29 i Tabeli 30, redom.

Tabela 29. Lista gena čija je ekspresija relativno kvantifikovana u srcu nakon forsiranog plivanja u viru. Podebljanim slovima su ispisani geni sa statistički značajno izmijenjenom ekspresijom.

Srce						
Simbol gena	Ime gena	Relativna promjena ± SD		P vrijednost	Funkcija	Ref.
		Kontrola	Tretman			
<i>cxcl12b</i>	<i>ligand za hemokin (C-X-C motv)</i>	1,00 ± 0,31	0,75 ± 0,23	0,24	mišićni rast i razviće	(138)
<i>igfbp2a</i>	<i>vezujući protein insulinu-sličnog faktora rasta</i>	1,00 ± 0,21	1,12 ± 0,69	0,75		(138)
<i>casq2</i>	<i>kalsekvestrin 2</i>	1,00 ± 0,36	1,05 ± 0,15	0,79	mišićna kontrakcija	(138)
<i>sparc</i>	<i>kiseli sekretovani protein bogat cisteinom (osteonektin)</i>	1,00 ± 0,24	1,56 ± 0,52	0,10	ekstraćelijski matriks	(138)
<i>colla1a</i>	<i>kolagen, tip I, alfa 1a</i>	1,00 ± 0,22	1,62 ± 0,27	0,04		(138)
<i>nppa</i>	<i>natriuretički peptid</i>	1,00 ± 0,21	0,94 ± 0,25	0,73	natriureza	(139)
<i>gpib</i>	<i>glukoza-6-fosfat izomeraza b</i>	1,00 ± 0,55	0,61 ± 0,08	0,21	metabolizam ugljenih hidrata	(138)
<i>gys1</i>	<i>glikogen sintaza 1</i>	1,00 ± 0,26	1,67 ± 0,46	0,04		(138)
<i>pkmb</i>	<i>piruvat kinaza M1, 2b</i>	1,00 ± 0,62	1,81 ± 1,65	0,39	metabolizam glukoze	(140)
<i>aldocb</i>	<i>aldolaza C, fruktozo-bisfosfat, b</i>	1,00 ± 0,26	1,23 ± 0,35	0,34		(141)
<i>ldha</i>	<i>laktat dehidrogenaza A4</i>	1,00 ± 0,27	1,17 ± 0,34	0,47		(140,141)
<i>lpl</i>	<i>lipoprotein lipaza</i>	1,00 ± 0,28	0,21 ± 0,10	0,002	metabolizam lipida	(138)
<i>ctrb1</i>	<i>himotripsinogen B1</i>	1,00 ± 1,15	18,70 ± 7,98	0,006	sinteza i degradacija proteina	(138)

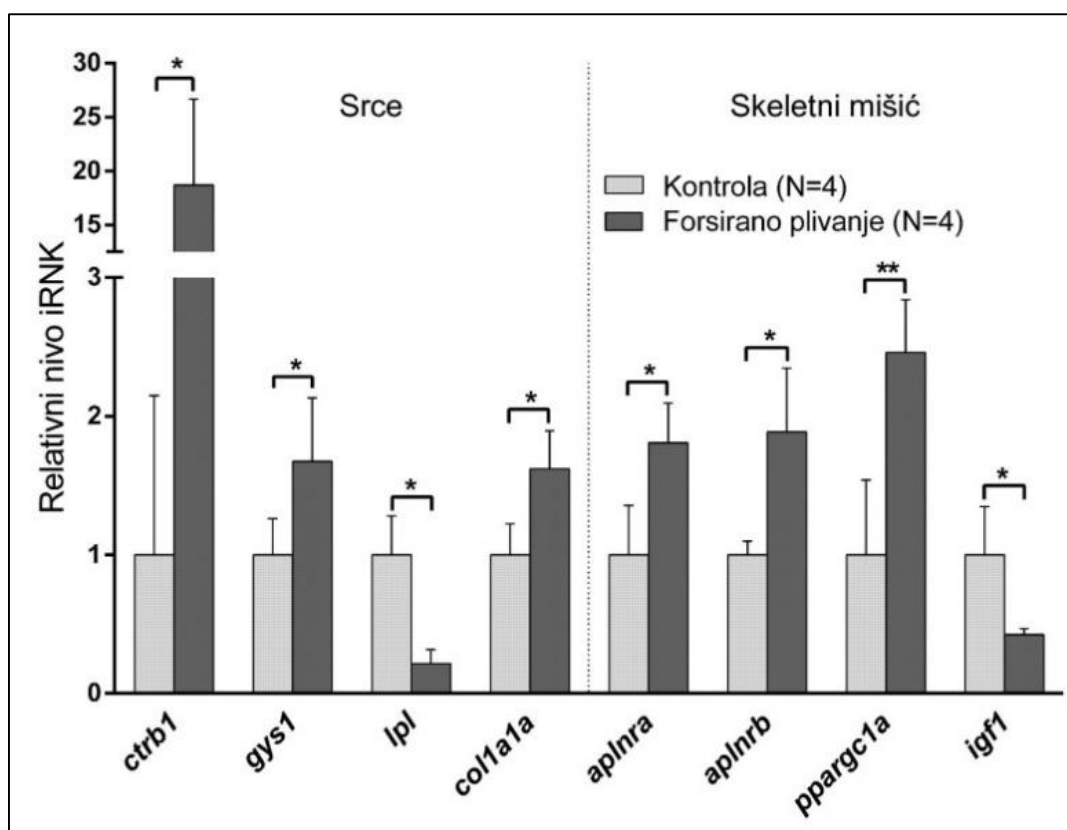
SD=standardna devijacija, Ref.=referenca.

Tabela 30. Lista gena čija je ekspresija relativno kvantifikovana u skeletnim mišićima nakon forsiranog plivanja u viru. Podebljanim slovima su ispisani geni sa statistički značajno izmijenjenom ekspresijom.

Skeletni mišić						
Simbol gena	Ime gena	Relativna promjena ± SD		P vrijednost	Funkcija	Ref.
		Kontrola	Tretman			
<i>ttni2b.2</i>	<i>troponin I, tip 2b</i>	1,00 ± 0,44	1,20 ± 0,64	0,63	mišićna kontrakcija	(142)
<i>tmod4</i>	<i>tropomodulin</i>	1,00 ± 0,38	0,62 ± 0,17	0,12		(142)
<i>casq1a</i>	<i>kalsekvestrin 1a</i>	1,00 ± 0,39	0,58 ± 0,16	0,09		(142)
<i>casq1b</i>	<i>kalsekvestrin 1b</i>	1,00 ± 0,39	0,55 ± 0,16	0,07		(142)
<i>tgfb2l</i>	<i>protein sličan transformišućem faktoru rasta beta 2</i>	1,00 ± 0,37	0,74 ± 0,15	0,24	mišićni rast i razvoj	(142)
<i>mstnb</i>	<i>miostatin b</i>	1,00 ± 0,58	0,57 ± 0,33	0,25		(142)
<i>col8a2</i>	<i>kolagen</i>	1,00 ± 0,49	1,29 ± 0,61	0,49	ekstraćelijski matriks	(142)
<i>lamc3</i>	<i>laminin, gama 3</i>	1,00 ± 0,31	1,18 ± 0,58	0,61		(142)
<i>cpt1b</i>	<i>karnitin palmitoiltransferaza</i>	1,00 ± 0,35	0,93 ± 0,51	0,82	metabolizam	(142)
<i>pfkfa</i>	<i>fosfofruktokinaza</i>	1,00 ± 0,42	0,86 ± 0,43	0,67		(142)
<i>cs</i>	<i>citrat sintaza</i>	1,00 ± 0,26	0,85 ± 0,29	0,47		(111,140)
<i>ppargc1a</i>	<i>koaktivator 1 alfa gama receptora aktiviranog proliferatorom peroksizoma</i>	1,00 ± 0,54	2,46 ± 0,37	0,004		(111)
<i>pdk2b</i>	<i>kinaza piruvat dehidrogenaze izozim 2b</i>	1,00 ± 0,46	0,52 ± 0,47	0,19	sinteza i degradacija proteina	(142)
<i>fbxo32</i>	<i>F-box protein 32</i>	1,00 ± 0,63	1,02 ± 1,01	0,97		(142)
<i>aplnra</i>	<i>apelin receptor a</i>	1,00 ± 0,35	1,81 ± 0,29	0,01	miokini	(143)
<i>aplnrb</i>	<i>apelin receptor b</i>	1,00 ± 0,10	1,89 ± 0,46	0,02		(143)
<i>igf1</i>	<i>insulinu-sličan faktor rasta 1</i>	1,00 ± 0,35	0,42 ± 0,04	0,04		(143)
<i>dcn</i>	<i>dekorin</i>	1,00 ± 0,25	1,02 ± 0,28	0,90		(143)
<i>il6r</i>	<i>receptor interleukina 6</i>	1,00 ± 0,06	1,4 ± 0,67	0,28		(143)

SD=standardna devijacija, Ref=referenca.

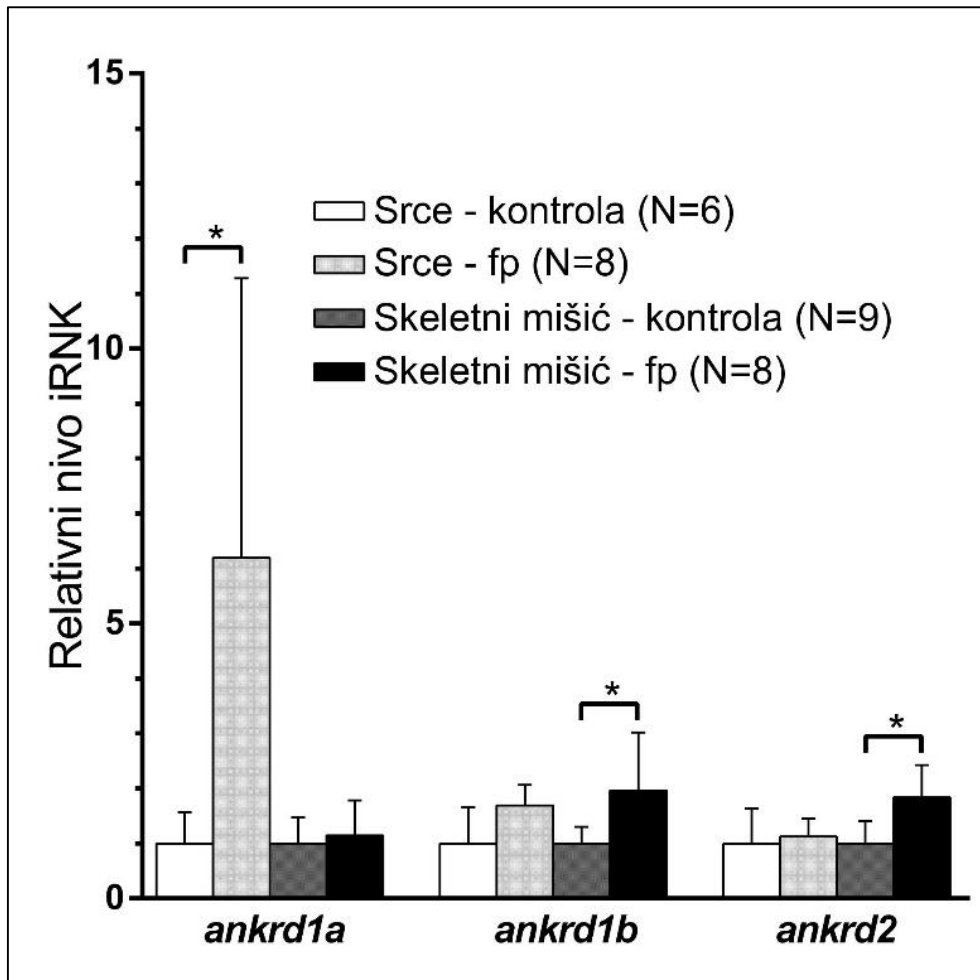
Statistički značajne promjene ekspresije detektovane su za pojedine gene u srcu (*coll1a1*, *gys1*, *lpl*, *ctrb1*) i skeletnim mišićima (*ppargc1*, *aplnra*, *aplnrb*, *igf1*) (Slika 29). Rezultati ukazuju da je protokol forsiranog plivanja u viru u trajanju od 5 dana izazvao transkripcioni odgovor u kome su aktivirani geni uključeni u metabolizam i remodelovanje ekstraćelijskog matriksa, kao i geni koji kodiraju miokine.



Slika 29. Geni čiji je nivo ekspresije statistički značajno promjenjen u srcu i skeletnim mišićima nakon forsiranog plivanja zebrića u viru. Nivoi su normalizovani na vrijednost kod kontrolne grupe za svaki gen. *ctrb1*=himotripsinogen B1, *gys1*=glikogen sintaza 1, *lpl*=lipoprotein lipaza, *coll1a1a*=kolagen tip1 alfa 1a, *aplnra*=apelin receptor a, *aplnrb*=apelin receptor b, *ppargc1a*=koaktivator 1 alfa gama receptora aktiviranog proliferatorom peroksizoma, *igf1*=insulinu-sličan faktor rasta 1. N=broj bioloških replikata. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

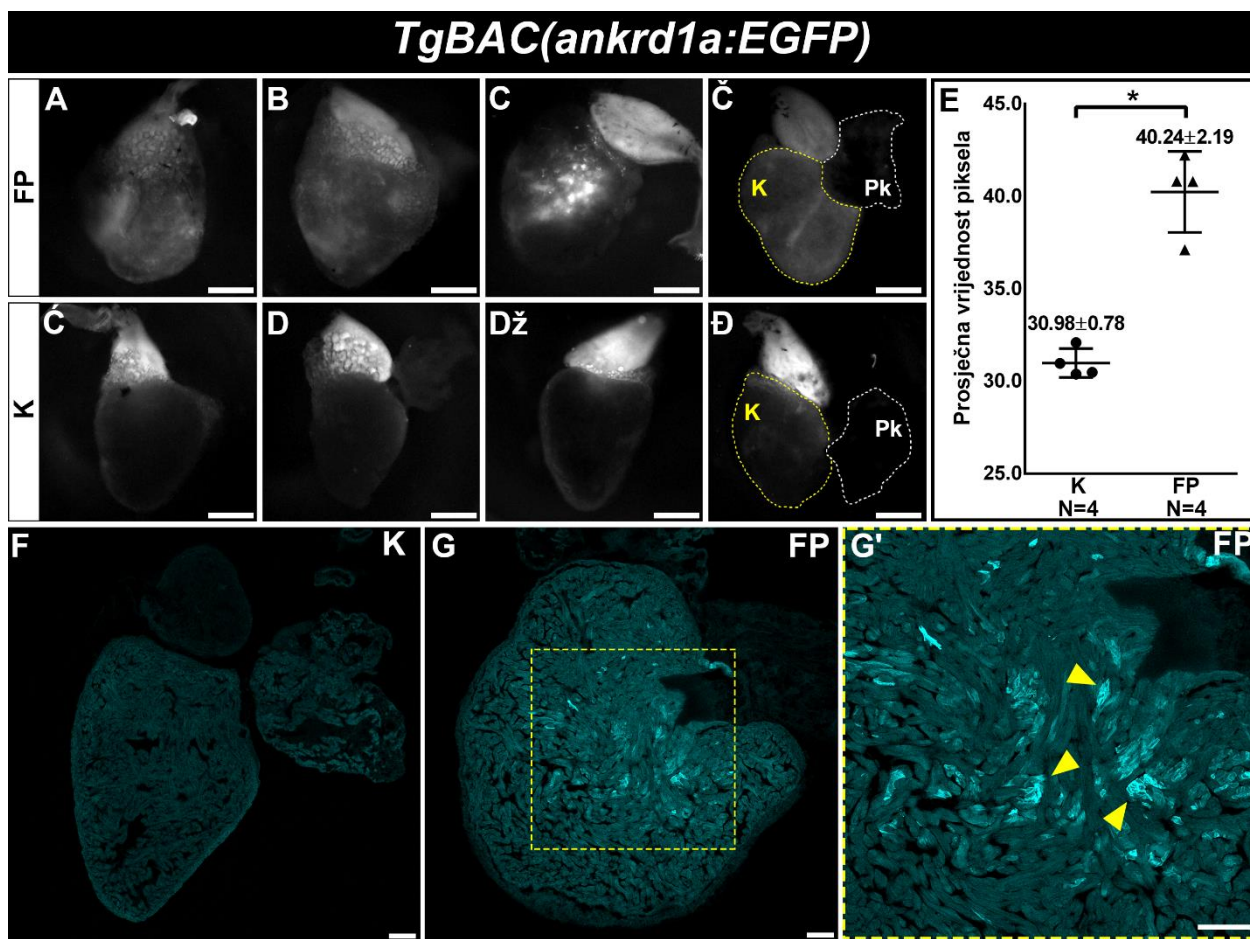
4.4.2. Ekspresioni odgovor gena *MARP* zebrića na forsirano plivanje u viru

Trening u formi forsiranog plivanja u viru je različito uticao na ekspresiju gena *MARP* (Slika 30). Statistički značajno veća količina transkripta *ankrd1a* detektovana je u srcu treniranih zebrića u odnosu na kontrolne jedinice ($6,19 \pm 5,08$, $1,00 \pm 0,57$, $P = 0,03$), dok u skeletnim mišićima nije zabilježena značajna razlika. Statistički značajno veća količina transkripta u skeletnim mišićima treniranih u odnosu na kontrolne jedinice je zabilježena za *ankrd1b* ($1,97 \pm 1,05$; $1,00 \pm 0,30$, $P = 0,02$) i *ankrd2* ($1,84 \pm 0,58$; $1,00 \pm 0,40$, $P = 0,003$). Nivoi transkripata *ankrd1b* i *ankrd2* nisu se značajno razlikovali u srcima treniranih i kontrolnih zebrića.



Slika 30. Ekspresija gena *MARP* u srcu i skeletnim mišićima zebrice nakon 5 dana forsiranog plivanja u viru. Vrijednosti su normalizovane na kontrolnu grupu za dato tkivo. fp=forsirano plivanje. N=broj bioloških replikata. * $P < 0,05$

Forsirano plivanje je u srcu *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* zebrica dovelo do statistički značajnog povećanja intenziteta EGFP signala u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 31. A-D). Intenzitet signala izmjeren je sa digitalnih snimaka srca 4 zebrice u treniranoj i kontrolnoj grupi, snimljenih pod istim uslovima, i izražen kao prosječna vrijednost piksela regiona komore (Slika 31 E). Za razliku od srca jedinki iz kontrolne grupe (Slika 31 F), na presjecima srca treniranih *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* zebrica uočeni su pojedini kardiomiociti trabekularnog sloja sa izraženo povišenom ekspresijom EGFP-a (Slika 31 G i G', žute strelice).



Slika 31. Uticaj forsiranog plivanja adultnih zebrica u viru na ekspresiju *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*. (A-Č) Srca zebrica podvrgnutih forsiranom plivanju (FP). (Ć-Đ) Srca kontrolne grupe zebrica (K). (E) Kvantifikacija i poređenje EGFP signala u komorama sa snimaka prikazanih na panelima A-Đ. Konfokalni snimci presjeka srca zebrice iz kontrolne (F) i grupe podvrgnute forsiranom plivanju (G). (G') Uvećan segment sa panela G, žute strelice pokazuju kardiomiocite sa izraženom ekspresijom EGFP. Razmjernik je 500 μm za A-Đ, 100 μm za F-G'. K=komora (oivičena žutom isprekidanom linijom), Pk=pretkomora (oivičena bijelom isprekidanom linijom).

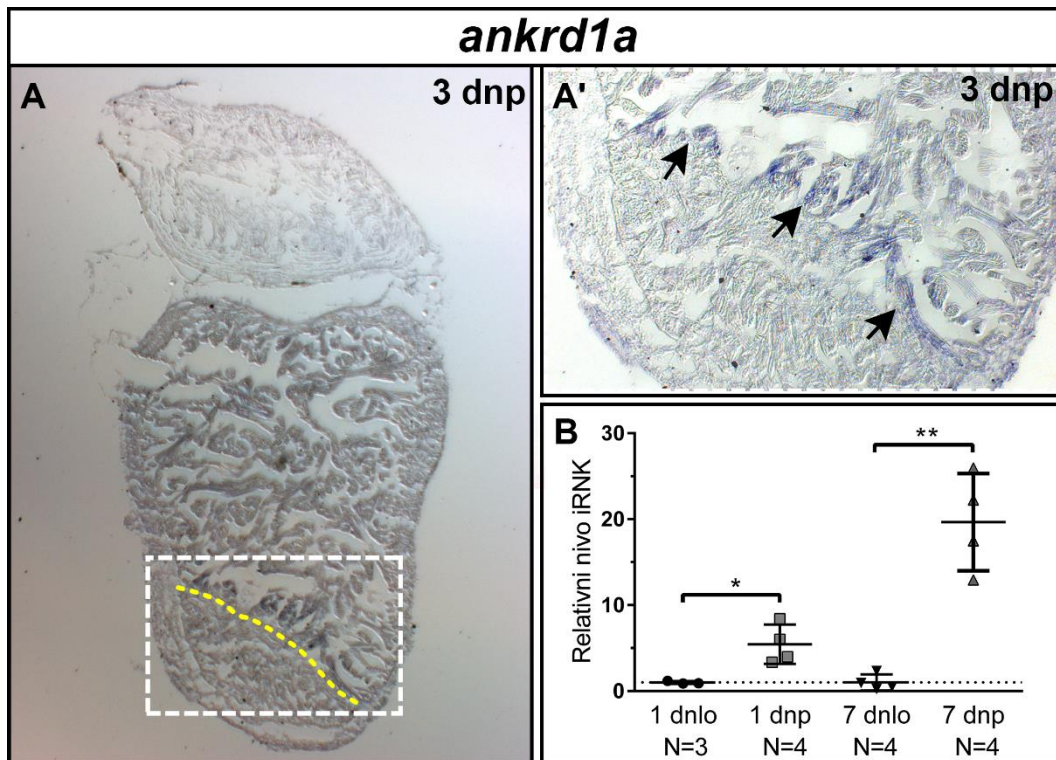
4.5. Ekspresija gena *ankrd1a* u povrijeđenom srcu adultne jedinke zebrice

Povišena ekspresija *ANKRD1* je karakteristična za patološka stanja srca čovjeka, uključujući infarkt miokarda i srčanu insuficijenciju (33,37). Rezultati analize transkriptoma kriopovrijeđenih srca zebrice (lična komunikacija sa dr Ruben Marin-Juez, Maks Plank institut za proučavanje srca i pluća, Bad Nauhajm, Njemačka), koji su ukazali na povećanu ekspresiju samo jednog člana familije MARP, *ankrd1a*, usmjerili su naša dalja istraživanja. Praćeni su nivo i lokalizacija transkripta *ankrd1a*, kao i reportera u transgenoj liniji *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*, čime su utvrđeni dinamika i specifična lokalizacija ekspresionog odgovora *ankrd1a* u graničnoj zoni povrede.

4.5.1. Kvantifikacija i lokalizacija ekspresije gena *ankrd1a* u srcu zebrice nakon kriopovrede

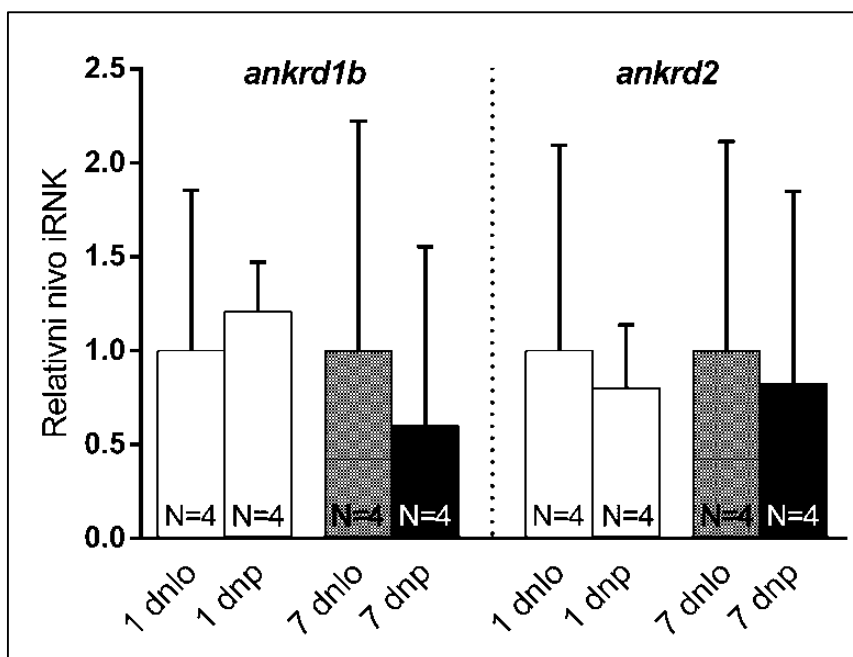
In situ RNK hibridizacijom na presjecima smrznutih srca 3 dana nakon povrede (dnp) transkript *ankrd1a* detektovan je u ćelijama graničnog regiona povrede (Slika 32 A i A'). Po poziciji i morfologiji, može se pretpostaviti da najveći dio obojenih ćelija čine kardiomiociti. Ekspresija gena *ankrd1a* u komori srca kvantifikovana je metodom RT-qPCR prvog i sedmog dana nakon kriopovrede (Slika 32 B). Statistički značajno veća količina transkripta zabilježena je u povrijeđenim srčanim

komorama u odnosu na lažno operisana srca nakon jednog ($5,45 \pm 2,28$; $1,00 \pm 0,17$, $P=0,02$) i sedam dana od kriopovrede ($19,65 \pm 5,66$; $1,00 \pm 0,93$, $P=0,0006$).



Slika 32. Ekspresija *ankrd1a* u komori srca zebrice nakon kriopovrede. (A) *In situ* hibridizacija na presjeku srca sa RNK probom specifičnom za transkript *ankrd1a* 3 dana nakon povrede. Žuta linija razgraničava region povrede od nepovređenog tkiva. (A') Uvećani region sa panela A. Strjelice pokazuju na obojene ćelije uz samu ivicu povrede. (B) Kvantifikacija ekspresije *ankrd1a* u komori srca nakon jednog i sedam dana od povrede. Vrijednosti su normalizovane na odgovarajuće vrijednosti za lažno operisanu grupu. dnlo-dana nakon lažne operacije, dnp-dana nakon povrede, N=broj bioloških replikata. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$.

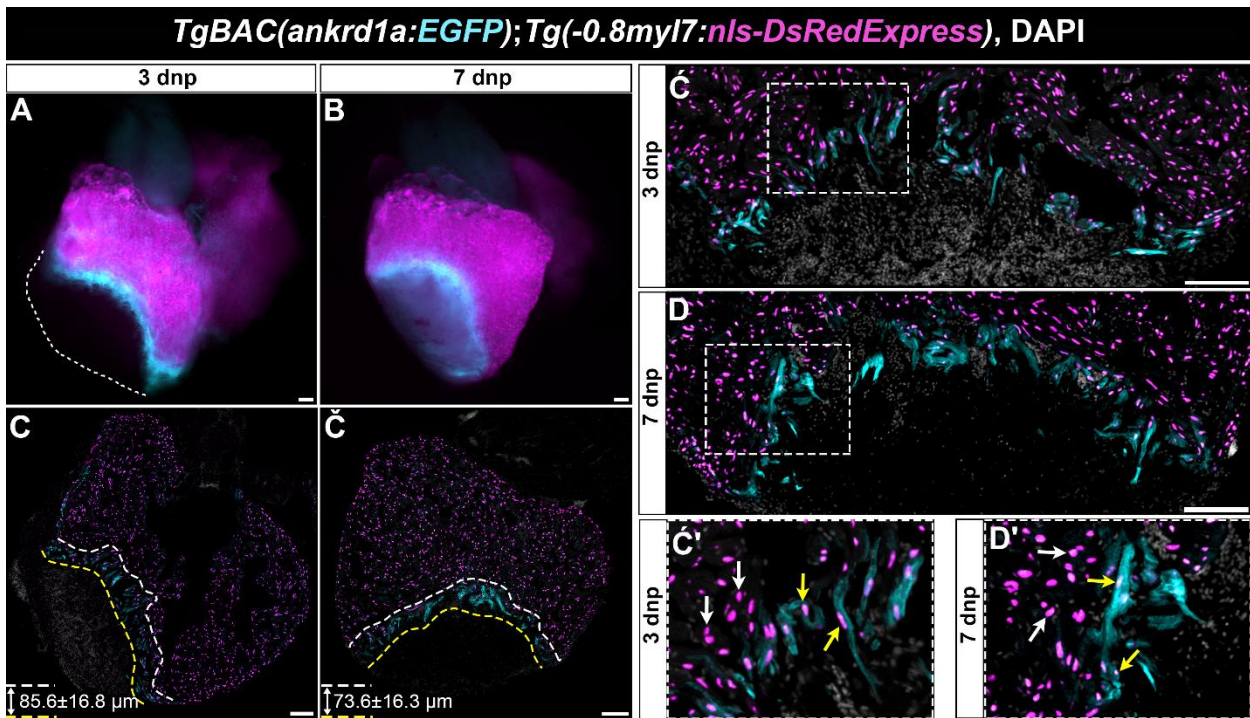
Za razliku od *ankrd1a*, nije došlo do značajne promjene ekspresije gena *ankrd1b* i *ankrd2* nakon kriopovrede srca zebrice u analiziranim vremenski tačkama (Slika 33).



Slika 33. Kvantifikacija ekspresije gena *ankrd1b* i *ankrd2* u komori srca zebrice prvog i sedmog dana nakon kriopovrede. Vrijednosti su normalizovane na odgovarajuće vrijednosti za lažno operisanu grupu. dnlo-dana nakon lažne operacije, dnp-dana nakon povrede. N=broj bioloških replikata.

4.5.2. Ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* u srcu zebrice nakon kriopovrede

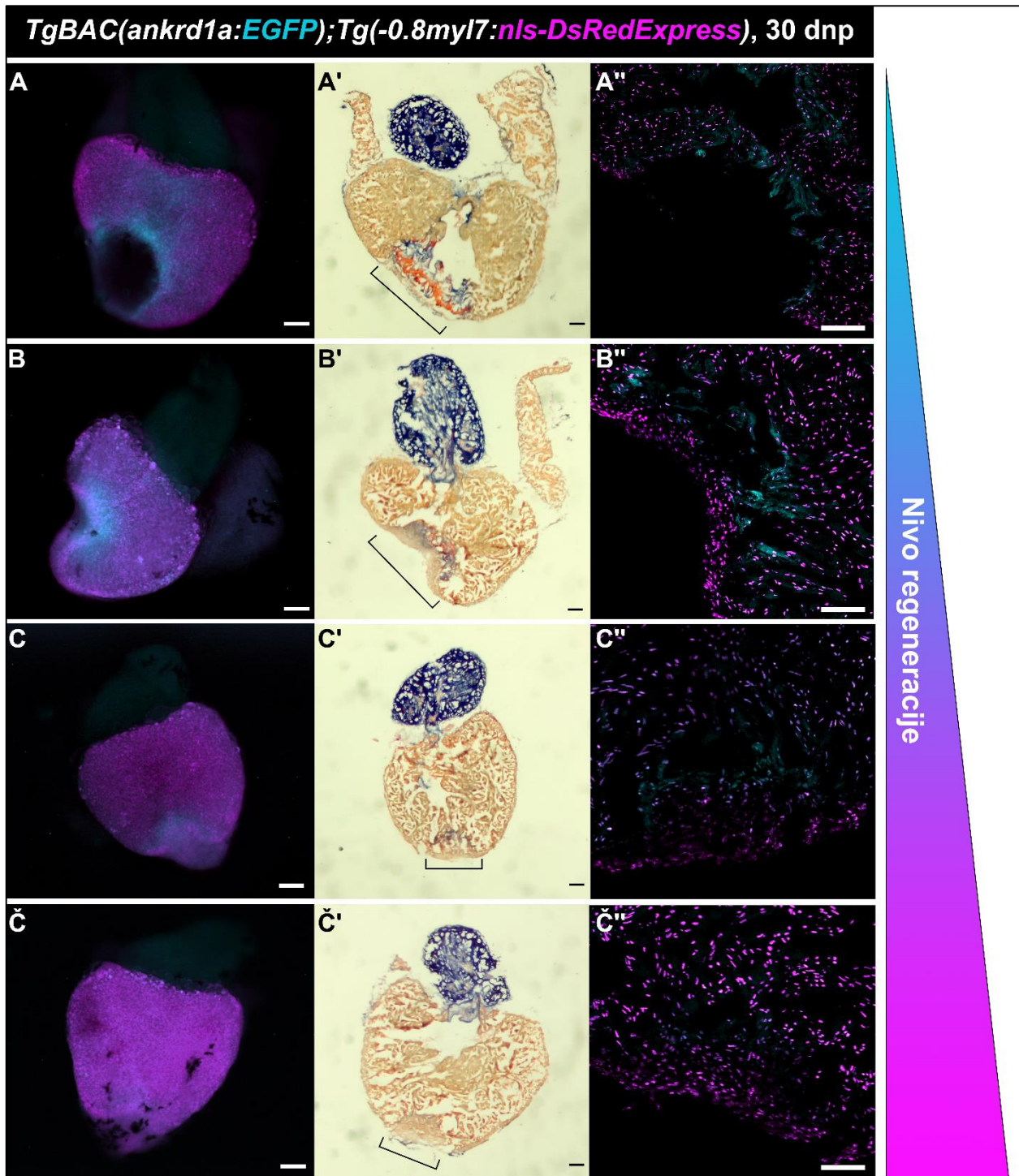
Rezultati *in situ* RNK hibridizacije na presjecima povrijeđenih srca su ukazali na aktivaciju ekspresije *ankrd1a* u kardiomiocitima. Kako bi lokalizovali ekspresioni odgovor *ankrd1a* sa većom rezolucijom generisana je linija sa obilježenim kardiomiocitima, *TgBAC(ankrd1a:EGFP);Tg(-0.8myl7:nls-DsRedExpress)*, ukrštanjem linija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* i *Tg(-0.8myl7:nls-DsRedExpress)*. Kardiomiociti ove dvostruke reporterske linije ekspimiraju fluorescentni marker dsRedExpress u jedrima, omogućavajući njihovu identifikaciju među brojnim drugim tipovima ćelija koje su vidljive na presjecima povrijeđenog srca, kao što su ćelije endokarda, eritrociti, miofibroblasti i drugi. Na osnovu preklapanja fluorescentnih signala, moguće je lokalizovati reporter EGFP u kardiomiocitima. EGFP je detektovan 3 i 7 dana nakon povrede srca zebrica linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP);Tg(-0.8myl7:nls-DsRedExpress)* (Slika 34). EGFP signal je jasno uočljiv po obodu regiona povrede u kojem odsustvo jedarnog reportera DsRedExpress ukazuje na zonu bez živih kardiomiocita (Slika 34 A i B). Na presjecima srca uočeno je da su EGFP⁺ ćelije prisutne u trabekularnom i kortikalnom sloju miokarda, formirajući zonu između regiona povrede i nepovrijeđenog tkiva širine $85,6 \pm 16,8 \mu\text{m}$ na 3 dnp i $73,6 \pm 16,3 \mu\text{m}$ na 7 dnp (Slika 34 C i Č). EGFP⁺ ćelije su istovremeno ekspimirale i reporter DsRedExpress, čime su identifikovane kao kardiomiociti (Slika 34 Č-Č' i D-D'). Na presjecima su takođe vidljiva brojna jedra obilježena samo DAPI bojenjem, koja najvjerojatnije pripadaju različitim vrstama ćelija koje se tipično nalaze u regionu povrede u prvih 7 dana nakon povrede (ćelije endokarda, eritrociti, trombociti, miofibroblasti i druge).



Slika 34. Srca zebrica linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP);Tg(-0.8myl7:nls-DsRedExpress)* 3 i 7 dana nakon povrede. (A-B) Fluorescentne mikrografije srca. Na panelu A, isprekidana linija označava ivicu komore. (C-Č) Konfokalni snimci presjeka povrijeđenih srca. Granični region povrede, sa EGFP⁺ ćelijama, oivičen je isprekidanim linijama. Žuta isprekidana linija predstavlja unutrašnju ivicu povrede, a bijela unutrašnji obod regiona sa EGFP⁺ ćelijama. Vrijednosti prosječne širine regiona sa EGFP⁺ ćelijama ± standardna devijacija su date u donjem lijevom uglu. (Č-D) Snimci fokusirani na granični region povrede. (Č'-D') Uvećani regioni sa panela Č i D. Žute strelice ukazuju na EGFP⁺/DsRedExpress⁺ kardiomiocite u graničnom regionu. Bijele strjelice pokazuju EGFP⁻/DsRedExpress⁺ kardiomiocite u neoštećenom tkivu. Razmjernik je 100 μm.

4.5.3. Ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* u djelimično regenerisanim srcima zeblice

Povrijeđena srca *TgBAC(ankrd1a:EGFP);Tg(-0.8myl7:nls-DsRedExpress)* zebrica (N=4) analizirana su 30 dana nakon povrede. Srca su pokazivala različit stepen regeneracije. U svim srcima, EGFP⁺ kardiomiociti su bili lokalizovani uz ivicu ožiljka (Slika 35 A-Č). Intenzitet signala bio je vidno veći kod zebrica sa obimnim ožiljkom bez znakova regeneracije (Slika 35 A'-A'') i djelimično regenerisanim miokardom (Slika 35 B'-B''). Kod srca kod kojih je regeneracija više napredovala (Slika 35 C'-C'') ili je skoro kompletna (Slika 35 Č'-Č''), EGFP signal je bio manjeg intenziteta, ali i dalje lokalizovan uz zaostale tragove kolagena. U kardiomiocitima regenerisanog tkiva komore srca, koje je vidljivo kao zadebljanje kortikalnog sloja miokarda uz zbijene trabekule, nije primjećena ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*.



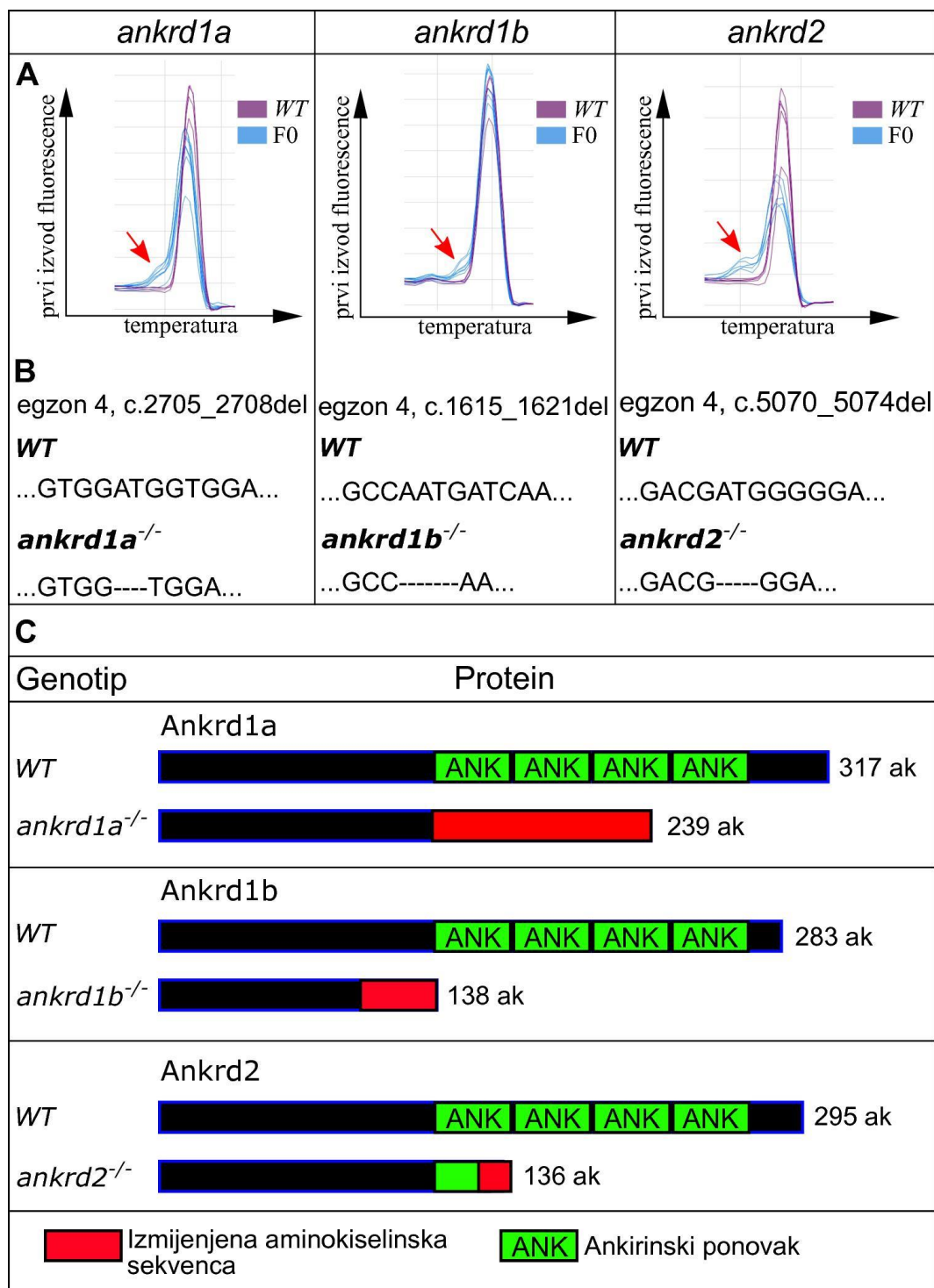
Slika 35. Srca linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP);Tg(-0.8myl7:nls-DsRedExpress)* 30 dana nakon kriopovrede, sa različitim nivoom regeneracije. (A-Č) Fluorescenca srca nakon disekcije snimljena fluorescentnom mikroskopijom. Serijalni presjeci korišćeni su za A.F.O.G. bojenje (A'-Č') i snimanje konfokalnom mikroskopijom (A''-Č''). Na panelima A'-Č', u označenom regionu povrede, kolagen je obojen plavo, fibrin narandžasto, a kardiomiociti braon. Gradijent sa desne strane ilustruje stepen regeneracije prikazanih srca. Razmjernik je 100 μ m. dnp=dana nakon povrede.

4.6. Uloga gena *MARP* u razviću zebrice i regeneraciji srca nakon kriopovrede

Uvođenjem mutacija u genom zebrice generišu se linije u kojima je protein od interesa nefunkcionalan. Ovakav pristup je od koristi u proučavanju uloge proteina u različitim biološkim procesima. Sa ciljem utvrđivanja funkcije članova familije *MARP* u razviću i odgovoru na stres, generisane su tri linije zebrice sa mutiranim genom *ankrd1a*, *ankrd1b*, odnosno *ankrd2*. Razviće generisanih mutanata posmatrano je od začeca do faze odrasle zebrice. S obzirom na ekspresioni profil *ankrd1a* nakon povrede srca, posebna pažnja je posvećena njegovoj ulozi u procesu regeneracije miokarda praćenjem proliferacije kardiomiocita i uklanjanja ožiljka.

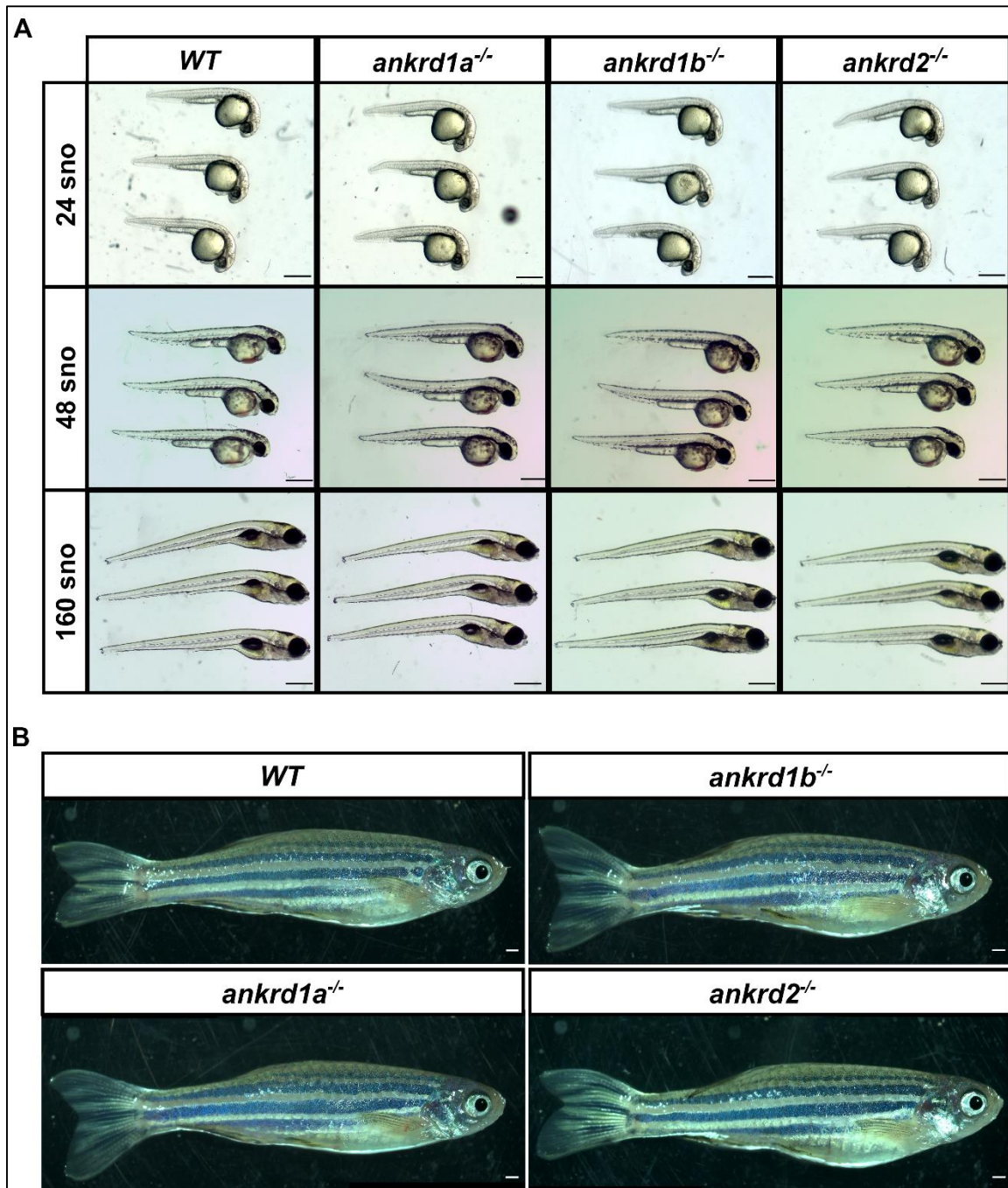
4.6.1. Analiza fenotipa zebrica sa mutacijama u pojedinačnim genima *MARP*

Mutanti su generisani primenom tehnologije CRISPR/Cas9. Mutacije su u svim genima *MARP* uvedene u egzone koji kodiraju prvi ankirinski ponovak. Ciljne sekvence u genomu su odabrane pomoću algoritma dostupnog na web strani www.crispr.mit.edu i na osnovu njih dizajnirani su oligonukleotidi potrebni za sintezu gRNK. Uvođenje promjena u kodirajuću sekvencu *MARP* gena zebrice u jedinkama F0 generacije potvrđeno je metodom HRMA (Slika 36 A). Nakon dostizanja polne zrelosti, jedinke F0 generacije su ukrštene sa jedinkama *WT*. Sekvenciranjem ciljnih lokusa jedinki F1 generacije, utvrđeno je prisustvo različitih mutacija u kodirajućem regionu ispitivanih gena. Za uspostavljanje mutantnih linija odabrane su jedinke F1 generacije nosioci delecije od 4 do 7 bp koja je dovela do pomjeranja okvira čitanja i formiranja preuranjenog stop kodona u kodirajućoj sekvenci. Odabrane mutacije su sumirane na Slici 36 B. Za sve tri mutacije, nosioci su genotipizirani primjenom metode HRMA. Predviđena proteinska sekvencu Ankrd1a, Ankrd1b i Ankrd2 kod mutanata izmijenjena je uslijed mutacija na način da su ankirinski ponovci u potpunosti uklonjeni uslijed formiranja preuranjenog „stop“ kodona (Slika 36 C).



Slika 36. Pregled mutacija gena *MARP* generisanih tehnologijom CRISPR/Cas9. (A) Analiza fragmenata genomske DNK F0 generacije mutanata za pojedinačne gene *MARP* i zebrica *WT* metodom HRMA. Crvena strelica pokazuje prisustvo drugog maksimuma izvoda funkcije fluorescence, tj. prisustva DNK fragmenata u formi heterodupleksa. (B) Položaj pojedinih mutacija u egzonu 4 gena *MARP* i prikaz dijela *WT* i mutirane sekvence. (C) Šematski prikaz strukture proteina *MARP* zebrica *WT* i očekivane strukture proteina kod mutanata. *WT*=divlji soj.

Kod homozigota za navedene mutacije nije primjećena razlika u fenotipu u odnosu na divlji soj tokom razvića (Slika 37 A) i kod adultnih jedinki (Slika 37 B). Jednike su vijabilne, njihovo razviće teče nesmetano i daju potomstvo.

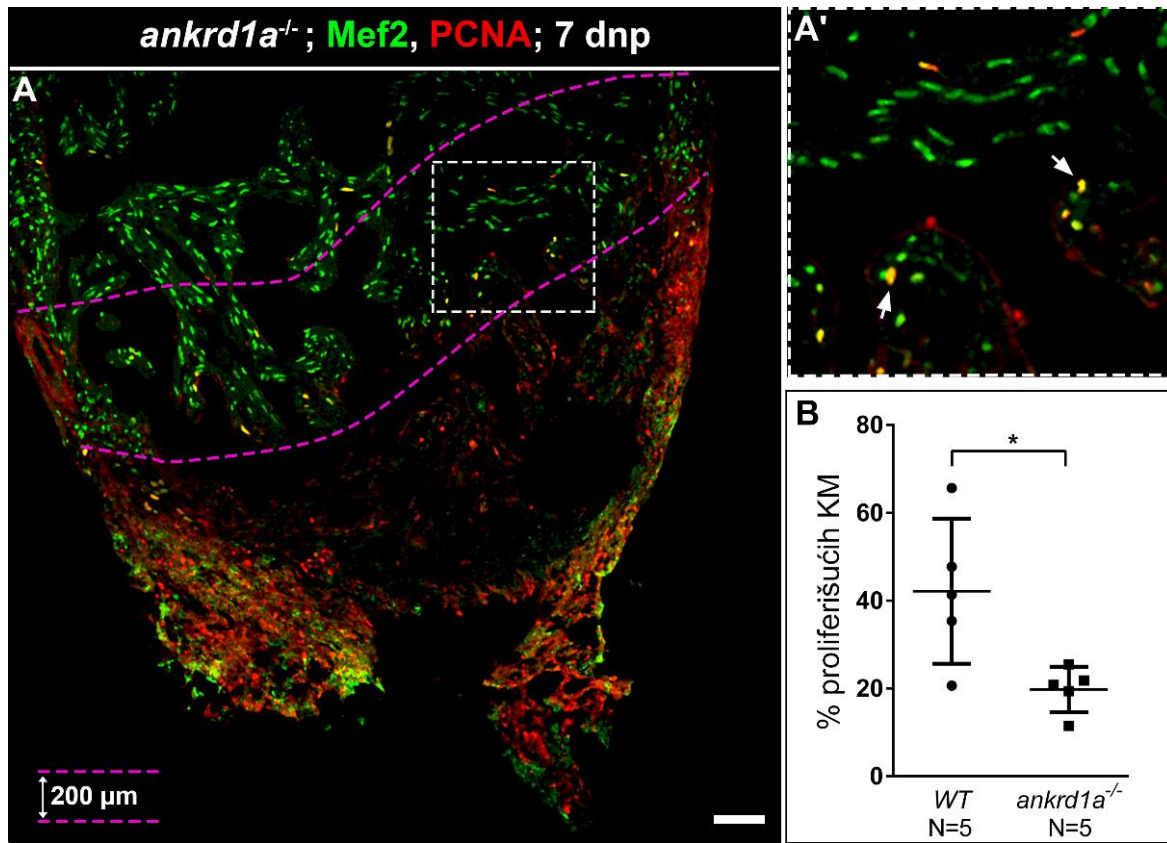


Slika 37. Izgled zebrice *WT* i mutanata za gene *MARP*. (A) Izgled *WT* i mutanata embriona i larvi tokom prvih 7 dana razvića. (B) Izgled adultnih jedinki *WT* soja i mutanata za *MARP* gene. Razmjernik je 500 μm za A i 1 mm za B. *WT*=divlji soj.

4.6.2 Proliferacija kardiomiocita zebrice *ankrd1a^{-/-}* nakon kriopovrede

Proliferacija kardiomiocita u komori srca *ankrd1a^{-/-}* zebrica analizirana je 7 dana nakon kriopovrede imunobojeanjem markera kardiomiocita Mef2 (eng. *Myocyte enhancer factor 2*) anti-Mef2 antitijelom i markera proliferišućih ćelija, PCNA (eng. *proliferating cell nuclear antigen*) anti-PCNA antitijelom (Slika 38 A-A'). Kao sekundarna, korišćena su antitijela konjugovana sa fluoroformama, specifična za miše (konjugat Alexa Fluor 647) i zečije (konjugat Alexa Fluor 488) imunoglobuline. U zebricama *ankrd1a^{-/-}* detektovana je proliferacija kardiomiocita kako u miokardu uz samu ivicu povrede, tako i u udaljenom dijelu miokarda. Zabilježena je statistički značajna razlika ($P=0,02$) u

procentu proliferišućih kardiomiocita, brojanih u pojasu širine 200 μm od same ivice povrede, između zebrica *WT* ($42,14 \pm 16,23$) i *ankrd1a*^{-/-} ($19,78 \pm 5,16$) (Slika 38 B).



Slika 38. Analiza proliferacije kardiomiocita u povrijeđenim komorama srca zebrice *ankrd1a*^{-/-}. (A) Imunobojenje presjeka komore srca zebrice *ankrd1a*^{-/-} sa anti-Mef2 i anti-PCNA antitijelima, 7 dana nakon povrede. Ljubičastim isprekidanim linijama oivičen je pojas širine 200 μm u kojem je vršena kvantifikacija proliferacije. (A') Uvećan region sa panela A, strelice pokazuju dvostruko pozitivne ćelije, obojene sa oba antitijela. (B) Kvantifikacija proliferacije kardiomiocita (KM) u srcima zebrica *WT* i *ankrd1a*^{-/-} 7 dana nakon povrede. Razmjernik je 100 μm . N=broj uzoraka. * $P < 0,05$. *WT*=divlji soj, dnp=dana nakon povrede.

4.6.3 Uklanjanje ožiljka tokom regeneracije srca kod *ankrd1a*^{-/-} zebrica

Proces uklanjanja ožiljka, sačinjenog od naslaga kolagena i fibrina, sastavni je dio procesa regeneracije srca zebrice. Kako bi analizirali ulogu gena *ankrd1a* u ovom procesu, presjeci povrijeđenih srca *WT* i *ankrd1a*^{-/-} zebrica 30 dana nakon kriopovrede su podvrgnuti A.F.O.G. bojenju koje omogućava razlikovanje ćelija, kolagena i fibrina na histološkim preparatima.

Sa snimaka dobijenih svetlosnom mikroskopijom kvantifikovana su 3 parametara na presjecima srca: površina komore, površina naslaga kolagena, i površina regenerisanog tkiva. Iz izmjerenih parametara izračunate su sledeće vrijednosti:

- ukupna površina povrede = površina naslaga kolagena + površina regenerisanog tkiva
- relativna površina ožiljka = površina naslaga kolagena / površina komore
- relativna regeneracija tkiva = površina regenerisanog tkiva / ukupna površina povrede

Rezultati su sumirani u Tabeli 31.

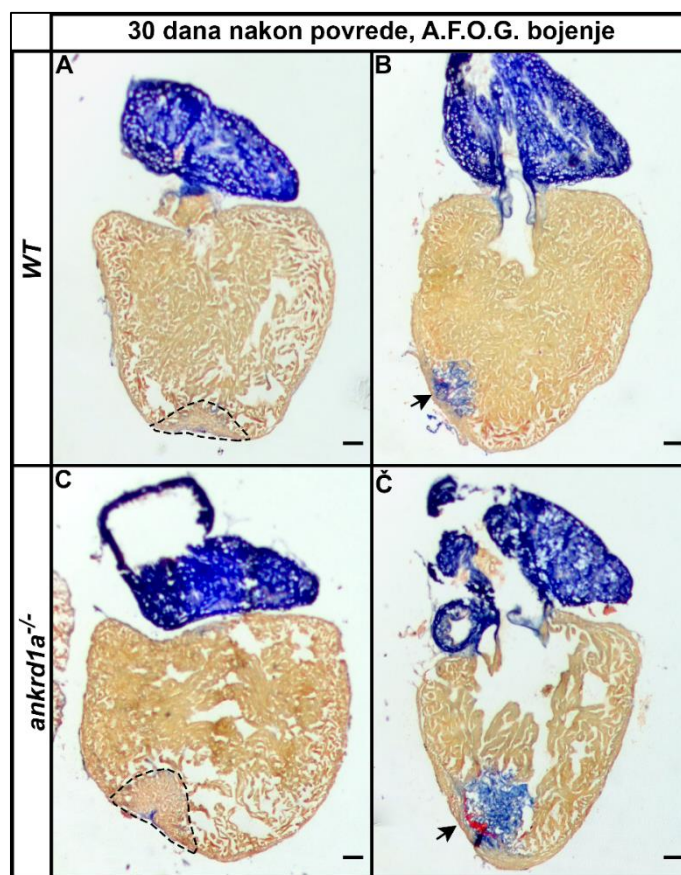
Tabela 31. Analiza regeneracije srca 30 dana nakon povrede kod zebrica genotipa *WT* i *ankrd1a*^{-/-}. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija.

Parametar	<i>WT</i>	<i>ankrd1a</i> ^{-/-}	<i>P</i> -vrijednost
Površina komore (mm ²)	1,35 ± 0,39	1,25 ± 0,17	0,56
Površina naslaga kolagena (mm ²)	0,04 ± 0,04	0,05 ± 0,06	0,79
Površina regenerisanog tkiva (mm ²)	0,06 ± 0,06	0,07 ± 0,03	0,87
Ukupna površina povrede (mm ²)	0,11 ± 0,06	0,12 ± 0,04	0,67
Relativna površina ožiljka (%)	3,44 ± 3,41	4,30 ± 5,25	0,75
Relativna regeneracija tkiva (%)	59,96 ± 33,22	65,04 ± 35,56	0,81

WT=divlji soj

Nije bilo statistički značajne razlike između zebrica *WT* i *ankrd1a*^{-/-} u analiziranim parametrima.

Unutar obje grupe zebrica primjećene su razlike u stepenu regeneracije srca nakon kriopovrede, pa je bilo jedinki kod kojih je došlo do gotovo kompletne regeneracije ali i onih kod kojih je zaostao primjetan ožiljak sačinjen od naslaga kolagena. Na reprezentativnim presjecima srca se vidi da nema razlike u strukturi regenerisanog dijela miokarda (Slika 39 A i C), kao ni u formi zaostalog ožiljka (Slika 39 B i Č) između zebrica genotipa *WT* i *ankrd1a*^{-/-}.



Slika 39. Reprezentativni preseći srca zebrica *WT* (A-B) i *ankrd1a*^{-/-} (C-Č) 30 dana nakon kriopovrede, posle A.F.O.G. bojenja. Na panelima A i C zone regenerisanog tkiva oivičene su isprekidanom linijom. Kolagen je obojen plavo, fibrin narandžasto, a kardiomiociti braon. Strjelice na B i Č pokazuju na zaostali ožiljak. Razmjernik je 100 µm. *WT*=divlji soj.

5. Diskusija

U ovoj studiji analizirana je evoluciona očuvanost i opisan je profil ekspresije članova proteinske familije MARP zebrice, koju čine *Ankrd1a*, *Ankrd1b* i *Ankrd2* (144). Generisanjem transgene reporterske linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* (145), kao i linija sa mutiranim genima *MARP* stekli su se uslovi za detaljnu analizu ekspresije i funkcije ove proteinske familije. Rezultati modelovanja mišićnog stresa forsiranim plivanjem (144) i kriopovredom srčane komore (145) pružili su uvid u funkciju proteina MARP u odgovoru na stres mišića i postavili temelj za njihovo dalje izučavanje u ovom model organizmu (145).

5.1. Evoluciona očuvanost strukture ortologa MARP

Bioinformatičkom analizom ortologa MARP zebrice i evoluciono udaljenih vrsta kao što su miš i čovjek, utvrđeni su njihovi evolucionari odnosi i potvrđena konzerviranost elemenata proteinske strukture ključnih za očuvanost njihove funkcije. Rezultati poređenja ortologa daju potporu daljem proučavanju MARP familije zebrice, ali i ukazuju na potencijalno važne razlike i specifičnosti koje treba uzeti u obzir u daljim istraživanjima na ovom model organizmu.

ANKRD1 čovjeka ima dva ortologa u genomu zebrice: *ankrd1a* i *ankrd1b*. Pojava više paraloga u genomu zebrice nije neuobičajena, već je karakteristika većine košljoriba i najvjerojatnije je posljedica procesa udvajanja djelova genoma do kojeg je došlo bar jednom u evolucionoj liniji košljoriba (146). U prilog ovakvom odnosu ortologa *ANKRD1* idu i rezultati analize sintenije. Raspored gena u neposrednoj okolini *ankrd1a* i *ankrd1b* zebrice i *ANKRD1* čovjeka jasno ukazuje na duplikaciju većih hromozomskih regiona u genomu zebrice i potvrđuju status ortologa. Sličnost hromozomskih regiona u kojima su *ANKRD2* čovjeka i *ankrd2* zebrice takođe ukazuje da su ova dva gena ortolozi. Kao što je i očekivano, struktura filogenetskog stabla, konstruisanog na osnovu poravnanja aminokiselinskih sekvenci proteina MARP nekoliko evoluciono udaljenih vrsta, pokazuje da ortolozi *ANKRD1* i *ANKRD2* segregiraju u zasebne grupe. *Ankrd1a* i *Ankrd1b* čine dvije bliske grane kod košljoriba, ukazujući da je do udvajanja došlo kod zajedničkog pretka. Treći član *MARP* familije, *ANKRD23* (poznat i kao *DARP*), nema svog ortologa u genomu zebrice. Ovaj gen se tokom evolucije javlja kod torbara i placentalnih sisara.

Na aminokiselinskom nivou, ortolozi MARP sisara i zebrice pokazuju umjerenu identičnost i sličnost. Podudaranju naročito doprinosi evoluciona očuvanost primarne strukture ankirinskih ponovaka. Ovi domeni su ključni za funkciju članova familije MARP, s obzirom da su neophodni za njihovu interakciju sa drugim proteinima. Upravo u regionu ankirinskih ponovaka se nalazi vezivno mjesto za domen N2A proteina titina (11), sa kojim članovi familije MARP grade signalozomski kompleks u I-traci sarkomere. Evoluciona očuvanost ankirinskih ponovaka ukazuje na njihov značaj za funkciju proteina MARP. Pored ankirinskih ponovaka, primjetne su i druge sličnosti u proteinskoj strukturi. Sekvenca NLS, potencijalni medijator jedarne lokalizacije proteina familije MARP sisara, prisutna je u *Ankrd1a* i *Ankrd2*. PEST motiv, za koji se smatra da omogućava brzu degradaciju signalnih proteina, identifikovan je u svim ortolozima MARP. Kao i kod sisarskih ortologa, kod *Ankrd1a* zebrice predviđeno je postojanje domena uvijenog uvojk, neophodnog za homo i heterodimerizaciju. Sličnosti u proteinskoj strukturi ortologa MARP ukazuju na očuvanost njihove funkcije čak i kod evoluciono udaljenijih vrsta kičmenjaka, kakve su čovjek i zebrica. Izvjesne razlike između ortologa ipak postoje. Motiv uvijenog uvojk nije identifikovan u *Ankrd1b* i *Ankrd2*, dok NLS sekvenca nije prisutna u *Ankrd1b*. Razlike između *Ankrd1a* i *Ankrd1b* mogle bi biti posljedica nedostatka selektivnog pritiska ka očuvanju oba paraloga. Nepoznato je da li su navedene razlike mogle dovesti do subspecijalizacije ili potpunog gubitka funkcije pojedinih proteina familije MARP zebrice.

5.2. Ekspresioni profil gena *MARP* zebrice

Kao i kod sisara, geni *MARP* eksprimirani su tokom razvića zebrice. Količina transkripata *ankrd1a* i *ankrd1b* raste tokom početne faze razvića (do 7 dana nakon oplođenja). S obzirom da je njihova ekspresija lokalizovana u somitima trupa i repa, ovakav trend najvjerovatnije oslikava progresivnu proliferaciju i diferencijaciju ćelija ka mišićnom fenotipu tokom prvih 7 dana razvića. Primjetna je razlika u dinamici i lokalizaciji transkripata ova dva paraloga; ekspresija *ankrd1a* je najintenzivnija na površini miotoma rostralnog dijela trupa i prethodi ekspresiji *ankrd1b* u cjelokupnoj masi miotoma repa. Nijedan od ova dva transkripta nije detektovan u srcu u odabranim stadijumima razvića, što je iznenađujuće s obzirom da je srce identifikovano kao primarno mjesto ekspresije *Ankrd1* tokom razvića miša (12). Ekspresija ortologa *ANKRDI* zabilježena je u fetalnim skeletnim mišićima čovjeka (13), miša (7) i pacova (6), što je u skladu sa ekspresionim profilom zebrice. Promjene strukture regulatornih elemenata promotorskog regiona mogle bi biti uzrok niske ili potpuno odsutne ekspresije gena *MARP* tokom razvića srca zebrice. Kuo i saradnici su pokazali da je ekspresija gena *Ankrd1* u dijelovima srca i skeletnim mišićima pod kontrolom zasebnih elemenata u okviru promotorskog regiona dugog 2,5 kb (15). Iako nije poznato koliko su ovi elementi evoluciono očuvani, na osnovu prikazanih rezultata može se pretpostaviti da je došlo do evolucione divergencije u strukturi regulatornih elemenata promotora dva paraloga gena zebrice, *ankrd1a* i *ankrd1b*, kojom je postignuta različita dinamika i lokalizacija njihove ekspresije. Alternativno, odsustvo ekspresije *ankrd1a* i *ankrd1b* u srcu potencijalno oslikava razlike u dinamici formiranja miokarda i stepenu mehaničkog opterećenja kojem je srce izloženo u najranijim fazama razvića sisara i zebrice.

Ekspresija gena *ankrd2* nije pokazivala značajne varijacije tokom prvih 7 dana od začeca i bila je iznenađujuće niska, što je dokumentovano kvantifikacijom ekspresije (Slika 20). Nivo transkripta *ankrd2* bio je ispod granice detektabilnosti metode *in situ* hibridizacije, čime je potvrđen nizak nivo ekspresije *ankrd2*. Izvjesno je da se profil ekspresije ovog gena tokom razvića razlikuje kod zebrice i sisara, pa se postavlja pitanje koliko je njegova funkcija u ovom procesu očuvana.

U adultnim jedinkama zebrice geni *MARP* su eksprimirani u srcu i skeletnim mišićima, što se podudara sa ekspresijom kod miša i čovjeka (11,13). Izuzev pretkomore, u kojoj *ankrd1a* ima nešto nižu ekspresiju, nisu primjećene razlike u intenzitetu ekspresije između komore srca i skeletnih mišića.

Navedeni rezultati pokazuju da, uz izvjesne istaknute razlike, geni *MARP* imaju vrlo sličan ekspresioni profil u mišićnim ćelijama zebrice i sisara, što ide u prilog uvođenju zebrice kao model organizma za njihovo proučavanje. Sa dostupnim genetičkim alatima, širokim spektrom transgenih reporterskih i mutantnih linija, kao i tehnikama vizuelizacije procesa razvića, zebrica je zasigurno vrijedan dodatak ovom polju istraživanja.

5.3. Praćenje ekspresije *ankrd1a* u reporterskoj liniji zebrice *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*

Generisanjem reporterske linije zebrice *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* iskoristili smo veliku prednost zebrice kao modela za proučavanje razvića i, posredstvom reportera EGFP, pratili ekspresiju *ankrd1a* sa rezolucijom na nivou ćelije. Tol2-posredovana transgeneza je uspješno iskorišćena kao alat za genomsku integraciju konstrukta dugog oko 174 kb, u kome se nalazi regulatorni region gena *ankrd1a*. Međutim, iako je veći broj jedinki F0 generacije eksprimirao transgen, efikasnost integracije konstrukta *BAC(ankrd1a:EGFP)* u germinativnu liniju zebrice bila je niska. Svega jedna od 20 jedinki prenosila je konstrukt u F1 generaciju. Rezultati drugih studija ukazuju da procenat uspješnosti znatno varira, zavisno od konstrukta, od 5% do 100% (133). Najveća efikasnost integracije se postiže pri injektiranju one količine konstrukta koja izaziva malformacije tokom razvića kod 30-50% embriona (133). Iako procenat malformacija i smrti injektiranih embriona nije apsolutno kvantifikovan u ovoj studiji, on je na osnovu lične opservacije svakako bio ispod 30%.

Ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* rekapitulira endogenu ekspresiju *ankrd1a*. Očekivano, EGFP omogućava osjetljiviju detekciju ekspresije u poređenju sa *in situ* hibridizacijom RNK probama obilježenim DIG-om. Osim toga, penetrabilnost RNK probe koja može ograničiti detekciju transkripta u dubljim strukturama larve, ne predstavlja problem za endogeno ekspimirani reporter. Početak ekspresije transgena *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* je uočen na stadijumu razvića od 18 somita. Kako je potrebno izvjesno vrijeme da reporter EGFP zauzme konformaciju u kojoj fluorescira, njegova ekspresija je najvjerovatnije počela nešto ranije. Najveći broj EGFP⁺ ćelija se na početku detekcije nalazi u regionu horizontalnog mioseptuma, da bi kasnije zauzele položaj na površini miotoma. Ovakva promjena položaja opisana je za adaksijalne ćelije koje tokom formiranja mišića migriraju i diferenciraju se u spora mišićna vlakna na površini embriona (52). Vjerovatno je da ekspresija *ankrd1a* započinje tokom rane faze formiranja sporih mišićnih vlakana, pod uticajem signala iz notohorde, i ostaje aktivna u diferenciranim vlaknima tokom prvih pet dana razvića. Optički presjeci mišića glave takođe potvrđuju ekspresiju *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* u sporim mišićnim vlaknima. Mala preklapanja signala porijeklom od imunobojenja antitijelima na reporter EGFP i marker brzih mišićnih vlakana na granicama mišićnih zona, posljedica su ograničavajuće rezolucije optike mikroskopa na datom uvećanju, za razliku od drastičnog preklapanja signala kod imunobojenja antitijelima na reporter EGFP i univerzalni marker mišićnih vlakana. Iako je EGFP vidljiv u sporim mišićnim vlaknima od početka trupa do kraja repa, jasno je uočljiv opadajući gradijent intenziteta signala od rostralnog ka kaudalnom kraju larve. Poznato je da se, nakon inicijalnog uspostavljanja fenotipa pod uticajem proteina Hedgehog signalnog puta, spora mišićna vlakna dijele u grupe različite po osjetljivosti na međućelijsku signalizaciju (147). Ekspresija *ankrd1a* bi upravo mogla odražavati ovu heterogenost među sporim mišićnim vlaknima. Imajući u vidu osjetljivost Ankrd1 na mehaničko istezanje u mišićnim ćelijama (11), razlike u nivou ekspresije *ankrd1a* mogle bi biti posljedica razlike u mehaničkim silama i intenzitetu kontrakcija kojima su izložena mišićna vlakna u pojedinim tjelesnim segmentima zebriće. Na primer, mišići operkulumu larve, sastavljeni od sporih vlakana koja ekspimiraju *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*, zaduženi su za konstantne, spore i ritmične kontrakcije neophodne za disanje (148). Iako su ortolozi *ankrd1a* detektovani u skeletnim mišićima tokom razvića sisara, do sada nema podataka o ekspresiji ograničenoj na jedan tip vlakana. Zebrića, zbog specifične organizacije mišića, sa odvojenim zonama brzih i sporih mišića, pruža nov uvid u ekspresioni profil i potencijalnu ulogu Ankrd1a u razviću skeletnih mišića.

Kao i u slučaju transkripta *ankrd1a*, ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* nije primjećena u srcu na stadijumu 96 sno, potvrđujući da je ekspresija *ankrd1a* u najranijim fazama razvića srca odsutna ili izrazito niska.

Ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* uočena je u interneuromastima. Ove ćelije neuroektodermalnog porijekla formiraju se rano tokom razvića mehanosenzornog organa bočne linije zebriće i diferenciraju se u interkalirajuće neuromaste (149). Ono što je evidentno je da se *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* eksprimira kako u inteneuromastima posteriornog (u trupu i repu) tako i anteriornog (u glavi) sistema bočne linije. Nije poznato do koje faze razvića organa bočne linije je ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* aktivna, kao ni koja bi mogla biti uloga *ankrd1a* u ovim ćelijama. Analiza regiona u kojem se formira bočna linija sa većom rezolucijom, uz adekvatne markere neurona i ćelija glije koje se javljaju paralelno sa interneuromastima, pružila bi dodatan uvid i potencijalno otvorila mogućnost korišćenja linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* kao novog alata u aktuelnom izučavanju regeneracije ovog neurosenzornog organa zebriće (150).

U adultima reporterske linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* uočen je relativno nizak nivo ekspresije transgena u mišićima i srcu, slično kao i za gen *ankrd1a*. Niži nivo ekspresije EGFP u pretkomori u odnosu na komoru je u saglasnosti sa nivoima transkripta *ankrd1a* u djelovima srca. Treba pomenuti da je ekspresija Ankrd1 kod adulta kokoške detektovana u skeletnim mišićima, ali ne i u srcu (151). Kao i kod larvi, ekspresija je intenzivnija u mišićima rostralnog dijela trupa, ali presjeci otkrivaju da

ekspresija više nije ograničena na spora mišićna vlakna, već se sada može vidjeti i u brzim mišićima. Nije poznato u kojoj fazi razvića je započela ekspresija *ankrd1a* u brzim mišićnim vlaknima. Jedna od mogućnosti je tokom formiranja mase brzih mišića i preuzimanja glavne uloge u kretanju.

5.4. Uloga gena *MARP* familije u razviću zebrice

U proučavanju funkcije gena familije *MARP* korišćen je pristup reverzne genetike. Generisane su transgene zebrice kod kojih su aleli gena *MARP* bili mutirani primjenom tehnologije CRISPR/Cas9. Mutacije su odabrane tako da dovedu do formiranja preuranjenog „stop” kodona u kodirajućoj sekvenci za ankirinske ponovke. Uvođenje mutacija u region koji kodira ankirinske ponovke je bio primarni cilj mutageneze iz dva razloga. Prvo, mjesto vezivanja za domen N2A titina i druge partnere nalazi se u okviru ankirinskih ponovaka. Drugo, visok stepen očuvanosti ovih domena kod kičmenjaka ukazuje na njihov značaj za funkciju proteina.

Homozigoti za mutacije u pojedinačnim genima familije *MARP* ne pokazuju uočljivu promjenu fenotipa. Ovo nije iznenađujuće, imajući u vidu rezultate dobijene sa „nokaut” miševima koji ukazuju da proteini *MARP* mogu imati strukturnu i regulatornu ulogu u mišićnim ćelijama, ali da nisu ključni za razviće i normalno funkcionisanje organizma u bazalnim uslovima (38–40). Rezultati dobijeni na model sistemu zebrice u skladu su sa ovim nalazima, iako u okviru ove studije nisu analizirani trostruki mutanti, već samo homozigotni nosioci mutacija u pojedinačnim genima familije *MARP*.

5.5. Modelovanje povećane fizičke aktivnosti i njen uticaj na ekspresiju gena *MARP* zebrice

Kao što je opisano, modelovanje povećane fizičke aktivnosti riba izvodi se u posebno konstruisanim tunelima sa kontrolisanim i mjerljivim protokom vode. Kako ovakvi uređaji imaju relativno visoku cijenu, kupovina istih predstavlja preveliku investiciju za laboratorije koje nisu u potpunosti posvećene proučavanju fizičke aktivnosti riba. U ovoj studiji testirano je i primjenjeno jednostavnije i ekonomičnije rješenje, koje je inicijalno osmislio dr Sven Rajshauer (Maks Plank institut za proučavanje srca i pluća, Bad Nauhajm, Njemačka). Forsirano plivanje u viru, za koje se koristi oprema dostupna u gotovo svakoj laboratoriji, omogućava lak i reproducibilan način za testiranje efekata povećane fizičke aktivnosti malih riba poput zebrice. S obzirom da je pomenuti pristup po prvi put primjenjen u ovom radu, bilo je potrebno uporediti njegove efekte sa efektima konvencionalne metode modelovanja fizičke aktivnosti. Kao i kod plivanja u tunelu, 5 dana plivanja u viru dovelo je do promjena u ekspresiji gena uključenih u metabolizam i međućelijsku komunikaciju (miokini) (111,138,143).

Povećana ekspresija gena familije *MARP* u skeletnim mišićima sisara nakon različitih vidova opterećenja je već opisana (24–26). Kod zebrice je forsirano plivanje dovelo do povećanja ekspresije *ankrd1b* i *ankrd2* u skeletnim mišićima i *ankrd1a* u srcu. Ovi rezultati pokazuju da je promjena u ekspresiji u odgovoru na mišićni stres evoluciono očuvano svojstvo članova familije *MARP*, što ukazuje na njihovu potencijalno sličnu funkciju kod zebrica i sisara. Povećanje ekspresije *ankrd1a* u srcu zebrice nakon treninga forsiranim plivanjem u viru moglo bi se uporediti sa povećanom ekspresijom sisarskih ortologa u stanjima povišenog opterećenja srčanog mišića, poput vještački izazvanog rasta krvnog pritiska i ubrzanja srčanog ritma (32,33). Rezultati dobijeni na zebricama potvrđuju da je ekspresija *ankrd1a*, poput one kod sisarskih ortologa, osjetljiva na stres srčanog mišića. Ekspresija reportera linije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* nakon forsiranog plivanja u viru odražava ekspresiju endogenog *ankrd1a*. Razlika u nivoima ekspresije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* među kardiomiocitima, koja podsjeća na različit nivo ekspresije u vlaknima skeletnih mišića, ukazuje na heterogen odgovor ćelija srčanog mišića. Nije poznato da li su ćelije sa većim intenzitetom EGFP signala više pogođene u opterećenom mišiću, zbog svog položaja ili nekog drugog razloga, pa srazmjerno izloženosti stresu i eventualnom oštećenju kontraktilnog aparata aktiviraju ekspresiju reportera u različitoj mjeri. Takođe se postavlja pitanje da li postoje određeni segmenti komore koji

su više pogodeni intenzivnijim kontrakcijama. Linija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* potencijalno pruža mogućnost identifikacije lokalnih razlika u adaptaciji miokarda, kontrolisanjem intenziteta stresa kroz variranje trajanja i brzine forsiranog plivanja.

Protokol forsiranog plivanja u viru omogućio je modelovanje povećane fizičke aktivnosti i utvrđivanje njegovog uticaja na ekspresioni profil gena familije *MARP* zebrice. Pri poređenju rezultata analize ekspresije nakon opisanog protokola i objavljenih rezultata dobijenih korišćenjem konvencionalnih tunela, treba uzeti u obzir razlike u trajanju i intenzitetu plivanja u ovim eksperimentima. U ovoj studiji, plivanje se odvijalo punim intenzitetom u trajanju od 5 dana, dok je u studijama plivanja u tunelu protokol trajao 20 dana (111,142,143). Razlikom u dužini trajanja treninga bi se moglo objasniti zašto značajan broj gena, uključujući i *ankrd1a* u skeletnim mišićima, nije promijenio nivo ekspresije nakon 5 dana forsiranog plivanja u viru. Kada je intenzitet režima plivanja u pitanju, odsustvo standardizacije predstavlja izazov pri poređenju rezultata studija. Iz tog razloga, Palstra i saradnici, u svojim protokolima, uvode termin „optimalne brzine“, definisan kao brzina plivanja na kojoj je odnos utrošenog kiseonika po pređenom putu najmanji (152). Ograničenje protokola forsiranog plivanja u viru je nemogućnost preciznog određivanja brzine plivanja. S toga, iako se uslovi kod plivanja u viru mogu reprodukovati u uzastopnim izvođenjima protokola, nedostatak zajedničkih definišućih parametara ograničava poređenje rezultata dobijenih plivanjem u viru i plivanjem u tunelu. Dalje studije, u kojima bi brzina plivanja varirala i koje bi uzimale u obzir poznate varijacije u mišićnom naporu koje se javljaju duž tijela zebrice pri plivanju i doprinos različitim tipova mišićnih vlakana pokretima tijela (110), mogle bi pružiti detaljniji uvid u ulogu *MARP* familije u odgovoru na stres mišića.

5.6. Ekspresija gena *MARP* u toku regeneracije srca zebrice

Infarkt miokarda prati niz regulisanih procesa koji dovode do infiltracije inflamatornih ćelija, uklanjanja mrtvog tkiva, aktivacije proliferacije i transdiferencijacije ćelija oko mjesta povrede i konačnog formiranja ožiljka kroz deponovanje komponenti ekstrasćelijskog matriksa (153). Reparativnim procesom u srcu sisara nije moguće nadomjestiti gubitak kardiomiocita, već se rana faza remodelovanja završava formiranjem nekontraktilnog ožiljka sastavljenog pretežno od kolagena. Ovakvo stanje pokreće kompenzatorne i adaptivne procese u srcu, kako bi se nadomjestila oslabljena funkcija i izvršila adaptacija na novonastalo veće opterećenje mišićnog zida, kroz dalje remodelovanje koje najčešće vodi ka hipertrofiji, fibrozi i konačno, srčanoj insuficijenciji (154). Razumijevanje toka i regulacije reparativnog procesa je ključno za razvoj novih terapijskih pristupa u liječenju infarkta miokarda. Proučavanjem ovih procesa kod kičmenjaka poput zebrice, koji su u stanju da regenerišu srčani mišić, mogli bi se izolovati faktori neophodni za pospješivanje regenerativnog potencijala kod čovjeka i identifikovati nove terapijske mete.

U ovoj studiji korišćena je kriopovreda srca zebrice kao model infarkta miokarda. Proces u tkivu koji prate kriopovredu komore zebrice, kao što su apoptoza, inflamacija i fibroza, liče na procese opisane kod infarkta miokarda sisara. U kontrastu sa progresijom ovog patološkog stanja kod sisara, regenerativna sposobnost zebrice dovodi do uklanjanja ožiljka i obimne ćelijske proliferacije kojom se nadomješćuje izgubljeno tkivo u roku od dva mjeseca od povrede (122). Transkripcionom analizom segmentisanih zona srca (udaljena zona, granična zona i zona povrede) nakon infarkta miokarda identifikovana je ekspresija *ANKRD1* čovjeka i *Ankrd1* miša kao zajednički marker granične zone povrede miokarda (37). Rezultati ove studije pokazuju gotovo identičnu lokalizaciju ekspresije *ankrd1a* zebrice, uz povećanje nivoa transkripta u toku prvih 7 dana nakon povrede. Dodatnu rezoluciju u analizi ekspresije *ankrd1a* omogućila je detekcija reportera u liniji *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*, kojom je utvrđena aktivnost *ankrd1a* promotora u kardiomiocitima granične zone povrede široke oko 100 μm . Upravo u ovoj zoni dolazi do najintenzivnije proliferacije kardiomiocita 7 dana nakon povrede (155). Ćelije granične zone povrede karakteriše povećanje transkripcione aktivnosti i reaktivacija ekspresije embrionalnih gena (118,156,157). Među

ekspimiranim proteinima u ovim ćelijama je i embrionalna izoforma teškog lanca srčanog miozina (embCMHC, eng. *embryonal cardiac myosin heavy chain*), čija lokalizacija izuzetno podsjeća na lokalizaciju transkripta *ankrd1a* (155). Do ekspresije *ankrd1a* dolazi i kod modela povrede srca genetičkom ablacijom, takođe u neposrednoj blizini oštećenog tkiva (158). Navedeni rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu *Ankrd1a* u procesima regulacije embrionalnog transkripcionog programa, dediferencijacije i proliferacije kardiomiocita nakon povrede komore srca. Povreda komore nije značajno uticala na ekspresiju ostalih članova familije *MARP*, *ankrd1b* i *ankrd2*, što ukazuje da ovi geni nemaju značajnu ulogu u procesu regeneracije srca. Evidentno je da se mehanizmi regulacije ekspresije *ankrd1b* i *ankrd1a* razlikuju, kako tokom razvića, tako i u toku odgovora na povredu komore srca. Po svemu sudeći, *ankrd1a* je zadržao više sličnosti sa svojim sisarskim ortolozima, dok je mogući nedostatak evolucionog pritiska na paralogi *ankrd1b* mogao rezultirati izmjenom regulacije ekspresije, djelova proteinske strukture, a samim tim i funkcije.

Kao što se moglo očekivati, najveći broj kriopovrijeđenih srca nije kompletno regenerisao nakon 30 dana od povrede. Međutim, bilo je i slučajeva kada je regeneracija znatno sporije napredovala ili je bila potpuno zaustavljena, što se manifestovalo prisustvom većeg ožiljka sačinjenog od kolagena. Povezanost ekspresije *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* i zaostalog ožiljka u komorama srca regenerisanim u različitom obimu je intrigantna. Prvo, ona ukazuje da kardiomiociti granične zone povrede zadržavaju svoj karakterističan ekspresioni profil, bar kada je *ankrd1a* u pitanju, tokom procesa uklanjanja ožiljka. Drugo, regenerisani kardiomiociti, koji se nalaze između $EGFP^+$ kardiomiocita i spoljne ivice regiona povrede, ne ekspimiraju *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*. Pitanje kompletnosti procesa regeneracije srca zebrice postavili su Bertozzi i saradnici u svojoj studiji u kojoj su pokazali da većina regenerisanih srca ipak zadržava tragove kolagena. Osim toga, nivo proliferacije kardiomiocita koji se graniče sa ožiljkom (region nazvan „unutrašnja granična zona”) se vraća na bazalni, kao kod kardiomiocita u srcima bez zaostalog ožiljka, što ukazuje da je regenerativni proces u ovom regionu komore zaustavljen ili izrazito usporen (159). Sa druge strane, regenerisani kardiomiociti („spoljašnja granična zona”) pokazuju nediferenciran fenotip i odsustvo formiranih sarkomera. Naši rezultati ukazuju da, uprkos vraćanju na bazalni nivo proliferacije, oni i dalje pokazuju znake odgovora na stres, kao što je ekspresija *ankrd1a*. Odsustvo diferencijacije i uređenih sarkomera u regenerisanim kardiomiocitima moglo bi značiti da aktivnost *ankrd1a* promotora zavisi od statusa diferencijacije mišićne ćelije. Nepoznato je koji faktori, unutrašnji ili spoljašnji, regulišu ekspresiju *ankrd1a* u kardiomiocitima unutrašnje granične zone u poodmakloj fazi regeneracije. Jedno od mogućih objašnjenja moglo bi biti da je ekspresija *ankrd1a* u kardiomiocitima na granici sa nekontraktilnim tkivom odgovor na izmijenjene mehaničke sile kojima su te ćelije izložene uslijed narušene strukture i geometrije zida komore (160). Ehokardiografijom je pokazano da, iako komore u potpunosti povrate funkciju u roku od 60 dana, mobilnost regenerisanog zida komore ostaje u izvjesnoj mjeri izmjenjena (161). Ova pretpostavka dodatno je podržana eksperimentom forsiranog plivanja u viru, u kome je registrovana neuniformna aktivacija *ankrd1a* u kardiomiocitima nakon povećanog opterećenja srčanog mišića. Zanimljivo bi bilo proučiti ulogu *ankrd1a* u fibrozi komore srca, stanja do kojeg dolazi starenjem srca čovjeka i zebrice uslijed progresivne smrti kardiomiocita, a koje se kod zebrice može dodatno indukovati dužim izlaganjem forsiranom plivanju (113).

5.7. Uloga gena familije *MARP* u regeneraciji srca zebrice

Ekspresioni profil *ankrd1a* nakon kriopovrede srčane komore zebrice ukazivao je na potencijalnu ulogu ovog gena u procesu regeneracije. Analiza proliferacije kardiomiocita sugeriše da je mutacija u genu *ankrd1a* uticala na regulaciju ćelijskog ciklusa neposredno nakon povrede. Međutim, i pored inicijalno nižeg nivoa proliferacije kardiomiocita *ankrd1a*^{-/-} zebrica, analizom komora histološkim bojenjem 30 dana nakon povrede nije utvrđena značajna razlika u regenerativnoj sposobnosti između *ankrd1a*^{-/-} i *WT* zebrica. Iako ukupan broj regenerisanih kardiomiocita nije određen za oba genotipa, hipertrofija umjesto hiperplazije kardiomiocita je malo vjerovatan mehanizam nadomješćivanja

oštećenog tkiva kod *ankrd1a*^{-/-} zebrica, jer nije uočena razlika u površinama komore, povrede i regenerisanog tkiva između jedinki dva genotipa. Ovo znači da, iako utiče na proliferativni odgovor, bar u ranoj fazi regeneracije, *Ankrd1a* nije ključan za ovaj proces. Da li se nedostatak funkcionalnog *Ankrd1a* u kardiomiocitima na neki način nadomješta, kao na primjer genetičkom kompenzacijom (162), u ovom trenutku nije poznato.

U skorašnjoj studiji, van der Pijl i saradnici pružili su dokaze da *Ankrd1* povezuje N2A region titina sa aktinskim filamentima u sarkomeri, povećavajući pasivnu silu kojom se miofibrili opiru istezanju (163). Spriječavajući prekomjerno istezanje i skraćenje sarkomere, *Ankrd1* djeluje kao medijator reaktivno brzog „zaključavanja“ dužine sarkomera i spriječavanja njihovog oštećenja u uslovima mehaničkog stresa. Istu funkciju bi mogao imati *Ankrd1a* zebrice, s obzirom na njegovu ekspresiju u srcu opterećenom fizičkom aktivnošću kao i u kardiomiocitima pogođenim ekstenzivnim remodelovanjem ekstraćelijske sredine nakon povrede. Na potencijalnu ulogu *Ankrd1* u signalizaciji između sarkomere i jedra u odgovoru na hipertrofični stimulus ukazano je kod *Ankrd1*^{-/-} miševa (40). Iako mutacija u genu *ankrd1a* nije značajno uticala na konačan ishod regeneracije srca zebrice, naši rezultati ukazuju da je gubitak funkcionalnog *Ankrd1a* makar privremeno uticao na proliferaciju kardiomiocita. Buduća istraživanja će otkriti mehanizam uticaja nedostatka funkcionalnog *Ankrd1* na regulaciju ćelijskog ciklusa nakon povrede.

Povećan nivo transkripta *Ankrd1* je detektovan nakon generisanja ekscizionih rana na koži miša, u subkutanim skeletnim mišićima, inflamatornim ćelijama i keratinocitima (164). U istoj studiji je pokazano da prekomerna ekspresija ANKRD1 putem adenovirusne infekcije podstiče neovaskularizaciju. U *Ankrd1*^{-/-} miševima primjećen je problem u zarastanju ekscizionih rana na koži, koji je povezan sa narušenom funkcijom fibroblasta u formiranju kolagenoznog ožiljka (41). Jedan od potencijalnih mehanizama preko kojeg ANKRD1 utiče na remodelovanje ekstraćelijskog matriksa je kroz regulaciju aktivnosti metaloproteinaza (165). Međutim, opisani fenotip zarastanja rana kod *Ankrd1*^{-/-} miševa vezuje se direktno za ulogu ANKRD1 u fibroblastima. Pri analizi povrijeđenih komora srca zebrice nije primjećena ekspresija *ankrd1a*, ni transkripta direktno, ni *TgBAC(ankrd1a:EGFP)*, u drugoj populaciji ćelija osim u kardiomiocitima. Nisu primjećene ni značajne razlike u formi i veličini kolagenoznog ožiljka u srčanim komorama zebrice *ankrd1a*^{-/-} i *WT* 30 dana nakon povrede. Pitanje je da li je i u kojoj mjeri očuvana ekspresija i funkcija *ankrd1a* u fibroblastima zebrice.

Karakterizacija gena familije *MARP* u ovoj studiji prvi je korak ka rasvjetljavanju njihove uloge u adaptaciji i remodelovanju poprečno-prugastih mišića zebrice. Rezultati ove studije pružaju nove dokaze da su procesi kojim mišićna ćelija odgovara na stres konzervirani među kičmenjacima i ohrabruju dalje napore u rasvjetljavanju komunikacije između sarkomernih proteinskih kompleksa i jedra kod zebrice kao model organizma. U dosadašnjim istraživanjima familije *MARP* korišćeni su različiti modeli stresa, *in vivo* i *ex vivo*. Sa svim već pomenutim prednostima, zebrica bi mogla značajno doprinijeti proširenju spektra modela stresnih stanja i tkivnog remodelovanja, kako kod adultnih jedinki, tako i kod onih na larvenim stupnjevima koji omogućavaju praćenje procesa uživo.

Dalji pristup istraživanju familije *MARP* kroz modifikacije modela stresa usmjeren je ka preciznoj identifikaciji faktora koji regulišu i modifikuju njihovu ekspresiju. Na ovaj način bi se utvrdilo pod kojim uslovima ovi proteini ispoljavaju svoju funkciju, što bi nadalje usmjerilo analizu fenotipa mutanata za gene *MARP*. Mutacije u pojedinačnim genima *MARP* nisu dovele do vidljive promjene fenotipa, što otežava utvrđivanje funkcije proteina *MARP*. Generisanje dvostrukih i trostrukih mutanata gena *MARP*, kako bi se izbjegla eventualna kompenzatorna uloga ostalih članova familije, moglo bi dovesti do drugačijih rezultata. Analiza transkriptoma ćelija mutanata pružila bi uvid u

promjene u regulatornoj mreži aktiviranoj tokom odgovora na stres. Konačno, zebrica kao model organizam otvara mogućnost daljih genetičkih manipulacija, poput generisanja linija za prekomjernu ekspresiju, koje bi mogle pružiti dodatni uvid u funkciju članova familije MARP.

6. Zaključci

Na osnovu analize evolucione očuvanosti familije MARP zebrice, njihove ekspresije tokom razvića i odgovora na stres, kao i analize nosilaca mutacija u genima *MARP*, izvedeni su sledeći zaključci:

- Članovi familije MARP zebrice su po strukturi slični ortolozima evoluciono udaljenih vrsta što ukazuje na očuvanost njihove funkcije.
- Ekspresioni profili *ankrd1a* i *ankrd1b* tokom formiranja skeletnih mišića zebrice su slični ekspresiji sisarskih ortologa. Ekspresija *ankrd2* zebrice je izuzetno niska.
- Ekspresija *TgBAC(ankrd1a:EGFP)* vjerno rekapitulira ekspresiju *ankrd1a* i omogućava njeno lako praćenje, sa rezolucijom na nivou jedne ćelije.
- *ankrd1a* je eksprimiran u sporim mišićnim vlaknima tokom ranih faza razvića skeletnih mišića. Njegova ekspresija nije detektovana srcu.
- Primjenom protokola forsiranog plivanja u viru uspješno je modelovana povećana fizička aktivnost zebrice.
- Trening zebrice forsiranim plivanjem u viru je indukovao ekspresiju gena *MARP*, *ankrd1a* u srcu i *ankrd1b* i *ankrd2a* u skeletnim mišićima.
- Nakon kriopovrede komore srca zebrice, ekspresija *ankrd1a* lokalizovana je u kardiomiocitima graničnog regiona povrede, slično profilu ekspresije sisarskih ortologa nakon infarkta miokarda.
- U kasnoj fazi regeneracije srca (30 dana nakon povrede), *ankrd1a* je eksprimiran u kardiomiocitima unutrašnje zone povrede, uz zaostali ožiljak, ali ne i u regenerisanim kardiomiocitima.
- Zebrice u kojima mutacije u genima *MARP* dovode do formiranja preuranjenog „stop“ kodona nemaju očigledne promjene fenotipa u odnosu na jedinke *WT* i razviće im teče neometano.
- *ankrd1a* učestvuje u regulaciji proliferacije kardiomiocita nakon kriopovrede srca zebrice.
- Ekspresija nefunkcionalnog *Ankrd1a* nema uticaja na krajnji ishod regeneracije srca zebrice.

7. Literatura

1. Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;146:159–216.
2. Burkholder TJ. Mechanotransduction in skeletal muscle. *Front Biosci.* 2007;1;12:174–91.
3. Buyandelger B, Ng K-E, Miocic S, Gunkel S, Piotrowska I, Ku C-H, et al. Genetics of mechanosensation in the heart. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4(3):238–44.
4. Linke WA. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2008;77(4):637–48.
5. W C, Dk B, Ra S, Dh P. Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270(17):10236–45.
6. Baumeister A, Arber S, Caroni P. Accumulation of muscle ankyrin repeat protein transcript reveals local activation of primary myotube endcompartments during muscle morphogenesis. *J Cell Biol.* 1997;139(5):1231–42.
7. Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE, et al. A Novel Cardiac-Restricted Target for Doxorubicin CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(36):22800–8.
8. Kemp TJ, Sadusky TJ, Saltisi F, Carey N, Moss J, Yang SY, et al. Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein. *Genomics.* 2000;66(3):229–41.
9. Pallavicini A, Kojić S, Bean C, Vainzof M, Salamon M, Ievolella C, et al. Characterization of Human Skeletal Muscle Ankrd2. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2001;285(2):378–86.
10. Ikeda K, Emoto N, Matsuo M, Yokoyama M. Molecular identification and characterization of a novel nuclear protein whose expression is up-regulated in insulin-resistant animals. *J Biol Chem.* 2003;278(6):3514–20.
11. Miller MK, Bang M-L, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, et al. The Muscle Ankyrin Repeat Proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a Family of Titin Filament-based Stress Response Molecules. *Journal of Molecular Biology.* 2003;333(5):951–64.
12. Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo H-C, Harvey RP, Chien KR. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. 1997;12.
13. Ishiguro N, Baba T, Ishida T, Takeuchi K, Osaki M, Araki N, et al. Carp, a Cardiac Ankyrin-Repeated Protein, and Its New Homologue, Arpp, Are Differentially Expressed in Heart, Skeletal Muscle, and Rhabdomyosarcomas. *The American Journal of Pathology.* 2002;160(5):1767–78.
14. Moriyama M, Tsukamoto Y, Fujiwara M, Kondo G, Nakada C, Baba T, et al. Identification of a novel human ankyrin-repeated protein homologous to CARP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285(3):715–23.
15. Kuo H, Chen J, Ruiz-Lozano P, Zou Y, Nemer M, Chien KR. Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development.* 1999;126(19):4223–34.

16. Kojic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Belgrano A, Stankovic M, Divac A, et al. A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010;502(1):60–7.
17. van Loo PF, Mahtab EAF, Wisse LJ, Hou J, Grosveld F, Suske G, et al. Transcription Factor Sp3 Knockout Mice Display Serious Cardiac Malformations. *Molecular and Cellular Biology*. 2007;27(24):8571–82.
18. Belgrano A, Rakicevic L, Mittempergher L, Campanaro S, Martinelli VC, Mouly V, et al. Multi-Tasking Role of the Mechanosensing Protein Ankrd2 in the Signaling Network of Striated Muscle. *PLOS ONE*. 2011;6(10):e25519.
19. Blais A, Tsikitis M, Acosta-Alvear D, Sharan R, Kluger Y, Dynlacht BD. An initial blueprint for myogenic differentiation. *Genes Dev*. 2005;19(5):553–69.
20. Bean C, Salamon M, Raffaello A, Campanaro S, Pallavicini A, Lanfranchi G. The Ankrd2, Cdkn1c and Calcyclin Genes are Under the Control of MyoD During Myogenic Differentiation. *Journal of Molecular Biology*. 2005;349(2):349–66.
21. Kojic S, Radojkovic D, Faulkner G. Muscle ankyrin repeat proteins: their role in striated muscle function in health and disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2011;48(5–6):269–94.
22. Kojic S, Medeot E, Guccione E, Krmac H, Zara I, Martinelli V, et al. The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *J Mol Biol*. 2004;339(2):313–25.
23. Chen Y-W, Nader GA, Baar KR, Fedele MJ, Hoffman EP, Esser KA. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. *The Journal of Physiology*. 2002;545(1):27–41.
24. Barash IA, Mathew L, Ryan AF, Chen J, Lieber RL. Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004;286(2):C355–64.
25. Hentzen ER, Lahey M, Peters D, Mathew L, Barash IA, Fridén J, et al. Stress-dependent and -independent expression of the myogenic regulatory factors and the *MARP* genes after eccentric contractions in rats: Differential gene expression with muscle contraction mode. *The Journal of Physiology*. 2006;570(1):157–67.
26. Koskinen SOA, Kyröläinen H, Flink R, Selänne HP, Gagnon SS, Ahtiainen JP, et al. Human skeletal muscle type 1 fibre distribution and response of stress-sensing proteins along the titin molecule after submaximal exhaustive exercise. *Histochem Cell Biol*. 2017;148(5):545–55.
27. Tsukamoto Y, Hijiya N, Yano S, Yokoyama S, Nakada C, Uchida T, et al. Arpp/Ankrd2, a member of the muscle ankyrin repeat proteins (MARPs), translocates from the I-band to the nucleus after muscle injury. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(1):55–64.
28. Nakamura K, Nakada C, Takeuchi K, Osaki M, Shomori K, Kato S, et al. Altered expression of cardiac ankyrin repeat protein and its homologue, ankyrin repeat protein with PEST and proline-rich region, in atrophic muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Pathobiology*. 2002 2003;70(4):197–203.
29. Nakada C, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, et al. Cardiac ankyrin repeat protein is preferentially induced in atrophic myofibers of congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathol Int*. 2003;53(10):653–8.

30. Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Takeda S, Sato K, et al. Cardiac-restricted ankyrin-repeated protein is differentially induced in duchenne and congenital muscular dystrophy. *Lab Invest.* 2003;83(5):711–9.
31. Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, et al. Altered expression of ARPP protein in skeletal muscles of patients with muscular dystrophy, congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathobiology.* 2004;71(1):43–51.
32. Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, Takeda S, et al. Cardiac Ankyrin Repeat Protein Is a Novel Marker of Cardiac Hypertrophy: Role of M-CAT Element Within the Promoter. *Hypertension.* 2000;36(1):48–53.
33. Zolk O, Frohme M, Maurer A, Kluxen F-W, Hentsch B, Zubakov D, et al. Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2002;293(5):1377–82.
34. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NMP, Lahmers S, et al. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2004;110(2):155–62.
35. Wei Y-J, Cui C-J, Huang Y-X, Zhang X-L, Zhang H, Hu S-S. Upregulated expression of cardiac ankyrin repeat protein in human failing hearts due to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(6):559–66.
36. Bogomolovas J, Brohm K, Čelutkienė J, Balčiūnaitė G, Bironaitė D, Bukelskienė V, et al. Induction of *Ankrd1* in Dilated Cardiomyopathy Correlates with the Heart Failure Progression [Internet]. Vol. 2015, *BioMed Research International.* Hindawi; 2015;e273936. Dostupno na: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/273936/>
37. van Duijvenboden K, de Bakker DEM, Man JCK, Janssen R, Günthel M, Hill MC, et al. Conserved *NPPB* + Border Zone Switches From MEF2- to AP-1–Driven Gene Program. *Circulation.* 2019;140(10):864–79.
38. Barash IA, Bang M-L, Mathew L, Greaser ML, Chen J, Lieber RL. Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2007;293(1):C218–27.
39. Bang M-L, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chien KR, Chen J. The Muscle Ankyrin Repeat Proteins *CARP*, *Ankrd2*, and *DARP* Are Not Essential for Normal Cardiac Development and Function at Basal Conditions and in Response to Pressure Overload. *PLOS ONE.* 2014;9(4):e93638.
40. Zhong L, Chiusa M, Cadar AG, Lin A, Samaras S, Davidson JM, et al. Targeted inhibition of *ANKRD1* disrupts sarcomeric ERK-GATA4 signal transduction and abrogates phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2015 May 1;106(2):261–71.
41. Samaras SE, Almodóvar-García K, Wu N, Yu F, Davidson JM. Global Deletion of *Ankrd1* Results in a Wound-Healing Phenotype Associated with Dermal Fibroblast Dysfunction. *The American Journal of Pathology.* 2015;185(1):96–109.
42. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2008;83(1):13–34.
43. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature.* 1981;291(5813):293–6.

44. Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*. 2002;3(9):717–24.
45. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498–503.
46. Chitnis A, Dalle Nogare D. Time-lapse imaging beyond the diffraction limit. *Methods*. 2018;150:32–41.
47. Choi T-Y, Choi T-I, Lee Y-R, Choe S-K, Kim C-H. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp Mol Med*. 2021;53(3):310–7.
48. Lai KP, Gong Z, Tse WKF. Zebrafish as the toxicant screening model: Transgenic and omics approaches. *Aquat Toxicol*. 2021;234:105813.
49. Gamble JT, Elson DJ, Greenwood JA, Tanguay RL, Kolluri SK. The Zebrafish Xenograft Models for Investigating Cancer and Cancer Therapeutics. *Biology (Basel)*. 2021;10(4):252.
50. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 1995;203(3):253–310.
51. Warga RM, Nüsslein-Volhard C. Origin and development of the zebrafish endoderm. *Development*. 1999;126(4):827-838.
52. Devoto SH, Melancon E, Eisen JS, Westerfield M. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development*. 1996;122(11):3371–80.
53. Stickney HL, Barresi MJF, Devoto SH. Somite development in zebrafish. *Dev Dyn*. 2000;219(3):287-303.
54. Jackson HE, Ingham PW. Control of muscle fibre-type diversity during embryonic development: The zebrafish paradigm. *Mechanisms of Development*. 2013;130(9–10):447–57.
55. Schilling TF, Kimmel CB. Musculoskeletal patterning in the pharyngeal segments of the zebrafish embryo. 1997;16.
56. Hatta K, Schilling T, BreMiller R, Kimmel C. Specification of jaw muscle identity in zebrafish: correlation with engrailed-homeoprotein expression. *Science*. 1990;250(4982):802–5.
57. Hernandez LP, Patterson SE, Devoto SH. The development of muscle fiber type identity in zebrafish cranial muscles. *Anat Embryol*. 2005;209(4):323–34.
58. Kemmler CL, Riemsdagh FW, Moran HR, Mosimann C. From Stripes to a Beating Heart: Early Cardiac Development in Zebrafish. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021;8(2):17.
59. Smith KA, Uribe V. Getting to the Heart of Left-Right Asymmetry: Contributions from the Zebrafish Model. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021;8(6):64.
60. Brown DR, Samsa LA, Qian L, Liu J. Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 2016;3(2):13.
61. Bise T, Sallin P, Pfefferli C, Jaźwińska A. Multiple cryoinjuries modulate the efficiency of zebrafish heart regeneration. *Sci Rep*. 2020;10(1):11551.
62. Hu N, Sedmera D, Yost HJ, Clark EB. Structure and function of the developing zebrafish heart. *The Anatomical Record*. 2000;260(2):148–57.

63. Rafferty SA, Quinn TA. A beginner's guide to understanding and implementing the genetic modification of zebrafish. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2018;138:3–19.
64. Woolfe A, Goodson M, Goode DK, Snell P, McEwen GK, Vavouri T, et al. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol*. 2005;3(1):e7.
65. Sanges R, Kalmar E, Claudiani P, D'Amato M, Muller F, Stupka E. Shuffling of cis-regulatory elements is a pervasive feature of the vertebrate lineage. *Genome Biol*. 2006;7(7):R56.
66. Shin JT, Priest JR, Ovcharenko I, Ronco A, Moore RK, Burns CG, et al. Human-zebrafish non-coding conserved elements act in vivo to regulate transcription. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(17):5437–45.
67. Wagner J, Thiele F, Ganten D. Transgenic animals as models for human disease. *Clin Exp Hypertens*. 1995;17(4):593–605.
68. Chan AWS. Progress and prospects for genetic modification of nonhuman primate models in biomedical research. *ILAR J*. 2013;54(2):211–23.
69. Otsuna H, Hutcheson D, Duncan R, McPherson A, Scoresby A, Gaynes B, et al. High-resolution analysis of CNS expression patterns in zebrafish Gal4 enhancer-trap lines. *Dev Dyn*. 2015;244(6):785–96.
70. Patra C, Kontarakis Z, Kaur H, Rayrikar A, Mukherjee D, Stainier DYR. The zebrafish ventricle: A hub of cardiac endothelial cells for in vitro cell behavior studies. *Scientific Reports*. 2017;7(1):2687.
71. Moro E, Vettori A, Porazzi P, Schiavone M, Rampazzo E, Casari A, et al. Generation and application of signaling pathway reporter lines in zebrafish. *Mol Genet Genomics*. 2013;288(5–6):231–42.
72. Chatterjee S, Lufkin T. Fishing for function: zebrafish BAC transgenics for functional genomics. *Mol BioSyst*. 2011;7(8):2345.
73. Li L, Miano JM, Mercer B, Olson EN. Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *J Cell Biol*. 1996;132(5):849–59.
74. Stuart GW, McMurray JV, Westerfield M. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development*. 1988;103(2):403–12.
75. Stuart GW, Vielkind JR, McMurray JV, Westerfield M. Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Development*. 1990;109(3):577–84.
76. Thermes V, Grabher C, Ristoratore F, Bourrat F, Choulika A, Wittbrodt J, et al. I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev*. 2002;118(1–2):91–8.
77. Soroldoni D, Hogan BM, Oates AC. Simple and efficient transgenesis with meganuclease constructs in zebrafish. *Methods Mol Biol*. 2009;546:117–30.
78. Koga A, Suzuki M, Inagaki H, Bessho Y, Hori H. Transposable element in fish. *Nature*. 1996;383(6595):30–30.
79. Suster ML, Kikuta H, Urasaki A, Asakawa K, Kawakami K. Transgenesis in zebrafish with the tol2 transposon system. *Methods Mol Biol*. 2009;561:41–63.

80. Kawakami K, Koga A, Hori H, Shima A. Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*. 1998;225(1–2):17–22.
81. Kawakami K, Shima A. Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene*. 1999;240(1):239–44.
82. Kawakami K. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biology*. 2007;8(1):S7.
83. Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, Kobayashi M, Matsuda N, Mishina M. A Transposon-Mediated Gene Trap Approach Identifies Developmentally Regulated Genes in Zebrafish. *Developmental Cell*. 2004;7(1):133–44.
84. Urasaki A, Morvan G, Kawakami K. Functional Dissection of the Tol2 Transposable Element Identified the Minimal cis-Sequence and a Highly Repetitive Sequence in the Subterminal Region Essential for Transposition. *Genetics*. 2006;174(2):639–49.
85. Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, Mangum BD, Hardy ME, Campbell DS, et al. The Tol2kit: A multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Developmental Dynamics*. 2007;236(11):3088–99.
86. Abe G, Suster ML, Kawakami K. 2011. Poglavlje 2 - Tol2-mediated Transgenesis, Gene Trapping, Enhancer Trapping, and the Gal4-UAS System. U: Detrich HW, Westerfield M, Zon LI, (Ur.). *The Zebrafish: Genetics, Genomics and Informatics*; vol. 104 (str. 23–49). *Methods in Cell Biology* [Internet]. Academic Press.
87. Suster ML, Sumiyama K, Kawakami K. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. *BMC Genomics*. 2009;10(1):477.
88. Garrick D, Fiering S, Martin DIK, Whitelaw E. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nature Genetics*. 1998;18(1):56–9.
89. Ruzicka L, Howe DG, Ramachandran S, Toro S, Van Slyke CE, Bradford YM, et al. The Zebrafish Information Network: new support for non-coding genes, richer Gene Ontology annotations and the Alliance of Genome Resources. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(D1):D867–73.
90. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. 2012;482(7385):331–8.
91. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467–77.
92. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirezada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602–7.
93. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–21.
94. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):E2579-2586.
95. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819–23.

96. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim J-S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 2013;31(3):230–2.
97. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. Weigel D, editor. *eLife.* 2013;2:e00471.
98. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823–6.
99. DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(7):4336–43.
100. Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell.* 2013;154(6):1370–9.
101. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology.* 2013;31(3):227–9.
102. Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Res.* 2013;23(4):465–72.
103. Jao L-E, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(34):13904–9.
104. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods.* 2013;10(10):957–63.
105. Attwaters M, Hughes SM. Cellular and molecular pathways controlling muscle size in response to exercise. *The FEBS Journal* [Internet]. Dostupno na: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.15820>
106. Matsakas A, Patel K. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. *Histol Histopathol.* 2009;24(2):209–22.
107. Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph A-M. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *Journal of Experimental Biology.* 2006;209(12):2265–75.
108. McGlory C, Phillips SM. 2015. Poglavlje 7 - Exercise and the Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy. U: Bouchard C (Ur.). *Molecular and Cellular Regulation of Adaptation to Exercise* vol 135. (str. 153–73). *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Academic Press.
109. Boström P, Mann N, Wu J, Quintero PA, Plovie ER, Panáková D, et al. C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell.* 2010;143(7):1072–83.
110. Coughlin DJ. Aerobic Muscle Function During Steady Swimming in Fish. *Fish and Fisheries.* 2002;3(2):63–78.
111. LeMoine CMR, Craig PM, Dhekney K, Kim JJ, McClelland GB. Temporal and spatial patterns of gene expression in skeletal muscles in response to swim training in adult zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Physiol B.* 2010;180(1):151–60.
112. Biga PR, Goetz FW. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291(5):R1327-1337.

113. Murphy LB, Santos-Ledo A, Dhanaseelan T, Eley L, Burns D, Henderson DJ, et al. Exercise, programmed cell death and exhaustion of cardiomyocyte proliferation in aging zebrafish. *Dis Model Mech* [Internet]; Dostupno na: <https://journals.biologists.com/dmm/article/doi/10.1242/dmm.049013/269103/Exercise-programmed-cell-death-and-exhaustion-of>
114. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001;344(23):1750–7.
115. Rubart M, Field LJ. Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:29–49.
116. Cutie S, Huang GN. Vertebrate cardiac regeneration: evolutionary and developmental perspectives. *Cell Regen*. 2021;10:6.
117. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart Regeneration in Zebrafish. *Science*. 2002;298(5601):2188–90.
118. Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, Burns CG, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*. 2006;127(3):607–19.
119. Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010;464(7288):606–9.
120. Zhao L, Borikova AL, Ben-Yair R, Guner-Ataman B, MacRae CA, Lee RT, et al. Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(4):1403–8.
121. Wang J, Panáková D, Kikuchi K, Holdway JE, Gemberling M, Burris JS, et al. The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development*. 2011;138(16):3421–30.
122. Chablais F, Veit J, Rainer G, Jazwińska A. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev Biol*. 2011;11:21.
123. Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-Olguín P, Holloway AK, et al. Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development. *Nat Commun*. 2011;2:187.
124. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, et al. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Research*. 2020;48(D1):D682–8.
125. Louis A, Muffato M, Roest Crolius H. Genomicus: five genome browsers for comparative genomics in eukaryota. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(D1):D700–5.
126. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. 2011;7(1):539.
127. Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics*. 2003;4(1):29.
128. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):5857–64.

129. Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Research* [Internet]. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>
130. Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*. 2000;16(6):276–7.
131. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(1):202.
132. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003;52(5):696–704.
133. Bussmann J, Schulte-Merker S. Rapid BAC selection for tol2-mediated transgenesis in zebrafish. *Development*. 2011;138(19):4327–32.
134. González-Rosa JM, Mercader N. Cryoinjury as a myocardial infarction model for the study of cardiac regeneration in the zebrafish. *Nature Protocols*. 2012;7(4):782–8.
135. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):676–82.
136. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1463–5.
137. Forster B, Ville DVD, Berent J, Sage D, Unser M. Complex wavelets for extended depth-of-field: A new method for the fusion of multichannel microscopy images. *Microscopy Research and Technique*. 2004;65(1–2):33–42.
138. Rovira i Berger M. Skeletal muscle and cardiac adaptations to swimming-induced exercise in adult zebrafish [Doktorska disertacija]. Barcelona: Univerzitet u Barseloni; 2016. Dostupno na: <http://hdl.handle.net/2445/110403>
139. Ibanez J, Gauquelin G, Desplanches D, Qiu HY, Dalmaz Y, Fareh J, et al. Atrial natriuretic peptide response to endurance physical training in the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1990;60(4):265–70.
140. Stuewe SR, Gwartz PA, Agarwal N, Mallet RT. Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(6):903–13.
141. Kanda K, Sugama K, Sakuma J, Kawakami Y, Suzuki K. Evaluation of serum leaking enzymes and investigation into new biomarkers for exercise-induced muscle damage. *Exerc Immunol Rev*. 2014;20:39–54.
142. Palstra AP, Rovira M, Rizo-Roca D, Torrella JR, Spaink HP, Planas JV. Swimming-induced exercise promotes hypertrophy and vascularization of fast skeletal muscle fibres and activation of myogenic and angiogenic transcriptional programs in adult zebrafish. *BMC Genomics*. 2014;15:1136.
143. Rovira M, Arrey G, Planas JV. Exercise-Induced Hypertrophic and Oxidative Signaling Pathways and Myokine Expression in Fast Muscle of Adult Zebrafish. *Front Physiol*. 2017;8:1063.
144. Boskovic S, Marín-Juez R, Jasnic J, Reischauer S, El Sammak H, Kojic A, et al. Characterization of zebrafish (*Danio rerio*) muscle ankyrin repeat proteins reveals their conserved response to endurance exercise. Du SJ, editor. *PLoS ONE*. 2018;13(9):e0204312.
145. Boskovic S, Marín Juez R, Stamenkovic N, Radojkovic D, Stainier DY, Kojic S. The stress responsive gene *ankrd1a* is dynamically regulated during skeletal muscle development and

upregulated following cardiac injury in border zone cardiomyocytes in adult zebrafish. *Gene*. 2021;792:145725.

146. Glasauer SMK, Neuhauss SCF. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol Genet Genomics*. 2014;289(6):1045–60.

147. Elworthy S, Hargrave M, Knight R, Mebus K, Ingham PW. Expression of multiple slow myosin heavy chain genes reveals a diversity of zebrafish slow twitch muscle fibres with differing requirements for Hedgehog and Prdm1 activity. *Development*. 2008;135(12):2115–26.

148. Hernandez LP, Patterson SE, Devoto SH. The development of muscle fiber type identity in zebrafish cranial muscles. *Anat Embryol*. 2005;209(4):323–34.

149. Ghysen A, Dambly-Chaudière C. The lateral line microcosmos. *Genes Dev*. 2007;21(17):2118–30.

150. Volpe BA, Fotino TH, Steiner AB. Confocal Microscope-Based Laser Ablation and Regeneration Assay in Zebrafish Interneuromast Cells. *J Vis Exp*. 2020;(159).

151. Ma G, Wang H, Gu X, Li W, Zhang X, Cui L, et al. CARP, a Myostatin-downregulated Gene in CFM Cells, Is a Novel Essential Positive Regulator of Myogenesis. *Int J Biol Sci*. 2014;10(3):309–20.

152. Palstra AP, Tudorache C, Rovira M, Brittijn SA, Burgerhout E, van den Thillart GEEJM, et al. Establishing Zebrafish as a Novel Exercise Model: Swimming Economy, Swimming-Enhanced Growth and Muscle Growth Marker Gene Expression. Calbet JAL, editor. *PLoS ONE*. 2010;5(12):e14483.

153. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. 2016;119(1):91–112.

154. Oliveira JB, Soares AASM, Sposito AC. Poglavlje 2 - Inflammatory Response During Myocardial Infarction. U: Makowski GS (Ur.). *Advances in Clinical Chemistry* (str. 39–79) [Internet]. Elsevier; 2018.

155. Sallin P, de Preux Charles A-S, Duruz V, Pfefferli C, Jaźwińska A. A dual epimorphic and compensatory mode of heart regeneration in zebrafish. *Developmental Biology*. 2015;399(1):27–40.

156. Wu C-C, Kruse F, Vasudevarao MD, Junker JP, Zebrowski DC, Fischer K, et al. Spatially Resolved Genome-wide Transcriptional Profiling Identifies BMP Signaling as Essential Regulator of Zebrafish Cardiomyocyte Regeneration. *Dev Cell*. 2016;36(1):36–49.

157. Tsedeke AT, Allanki S, Gentile A, Jimenez-Amilburu V, Rasouli SJ, Guenther S, et al. Cardiomyocyte heterogeneity during zebrafish development and regeneration. *Dev Biol*. 2021;476:259-271.

158. Goldman JA, Kuzu G, Lee N, Karasik J, Gemberling M, Foglia MJ, et al. Resolving Heart Regeneration by Replacement Histone Profiling. *Dev Cell*. 2017;40(4):392-404.e5.

159. Bertozzi A, Wu C-C, Nguyen PD, Vasudevarao MD, Mulaw MA, Koopman CD, et al. Is zebrafish heart regeneration “complete”? Lineage-restricted cardiomyocytes proliferate to pre-injury numbers but some fail to differentiate in fibrotic hearts. *Developmental Biology*. 2021;471:106–18.

160. Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest*. 127(5):1600–12.

161. González-Rosa JM, Guzmán-Martínez G, Marques IJ, Sánchez-Iranzo H, Jiménez-Borreguero LJ, Mercader N. Use of echocardiography reveals reestablishment of ventricular pumping efficiency and partial ventricular wall motion recovery upon ventricular cryoinjury in the zebrafish. *PLoS One*. 2014;9(12):e115604.
162. El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*. 2017;13(7):e1006780.
163. van der Pijl RJ, van den Berg M, van de Locht M, Shen S, Bogaards SJP, Conijn S, et al. Muscle ankyrin repeat protein 1 (MARP1) locks titin to the sarcomeric thin filament and is a passive force regulator. *J Gen Physiol*. 2021;153(7):e202112925.
164. Shi Y, Reitmaier B, Regenbogen J, Slowey RM, Opalenik SR, Wolf E, et al. CARP, a Cardiac Ankyrin Repeat Protein, Is Up-Regulated during Wound Healing and Induces Angiogenesis in Experimental Granulation Tissue. *The American Journal of Pathology*. 2005;166(1):303–12.
165. Almodóvar-García K, Kwon M, Samaras SE, Davidson JM. ANKRD1 Acts as a Transcriptional Repressor of MMP13 via the AP-1 Site. *Mol Cell Biol*. 2014;34(8):1500–11.

Biografija autora

Srđan Bošković je rođen 26.5.1986. u Podgorici, Republika Crna Gora. Na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija, diplomirao je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,52. Na istom fakultetu započeo je doktorske studije 2014. godine. Od 2015. godine zaposlen je u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Laboratorija za molekularnu biologiju, na nacionalnom projektu „Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa-strukturalna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera“ (ev. br. 173008), a trenutno je angažovan na projektu „Program rada IMGGI za 2021.“ (ev. br. 451-03-9/2021-14/200042). U istoj laboratoriji radi na realizaciji eksperimentalnog dela svoje doktorske teze pod mentorstvom dr Snežane Kojić i dr Dragice Radojković. Učesnik je i međunarodnog projekta naučno-tehnološke saradnje Republike Srbije i Savezne Republike Nemačke „Zebra-ribica (*Danio rerio*) kao model sistem za izučavanje uloge mišićnih proteina sa ankirinskim ponovcima Ankrd1 i Ankrd2 u razviću i regeneraciji srca“ (2015-2016). Dobitnik je stipendije za kraći istraživački boravak Nemačke kancelarije za akademsku razmenu-DAAD (2017.) i Wood-Wheelan stipendije međunarodnog društva za biohemiju i molekularnu biologiju (IUBMB, 2019.). Stručno usavršavanje i deo eksperimenata iz svoje doktorske teze, Srđan Bošković je uradio u Laboratoriji za genetiku razvića pod rukovodstvom prof. dr Didiera Stainiera (Maks Plank institut za proučavanje srca i pluća). Do danas, Srđan Bošković je objavio šest naučnih radova u međunarodnim časopisima i autor je tri saopštenja na međunarodnim kongresima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Срђан Бошковић

Број индекса М3005/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација гена *ankrd1a*, *ankrd1b* и *ankrd2* зебрице (*Danio rerio*) у развићу и одговору на стрес

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација ни у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 7.9.2021.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Срђан Бошковић

Број индекса: M3005/2014

Студијски програм: Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада: Карактеризација гена *ankrd1a*, *ankrd1b* и *ankrd2* зебрице (*Danio rerio*) у развићу и одговору на стрес

Ментори: др Снежана Којић, научни саветник (Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду); др Драгица Радојковић, научни саветник (Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду)

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктор наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 7.9.2021.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација гена *ankrd1a*, *ankrd1b* и *ankrd2* зебрице (*Danio rerio*) у развићу и одговору на стрес

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 7.9.2021.

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.