



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«Μελέτη του λειτουργικού ρόλου της πρωτεΐνης Set κατά  
τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού-μοντέλου  
*Danio rerio* (zebrafish)»**

**ΗΛΙΑΝΑ ΣΕΡΙΦΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«Μελέτη του λειτουργικού ρόλου της πρωτεΐνης Set κατά  
τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού-μοντέλου  
*Danio rerio* (zebrafish)»**

**ΗΛΙΑΝΑ ΣΕΡΙΦΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018**



« Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»





**Ημερομηνία αίτησης της κ Σερίφη Ηλιάννας: 19-6-2014**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 766<sup>α</sup>/10-7-2014**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Παπαμαρκάκη Θωμαή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Φριλίγγος Ευστάθιος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Χριστοφορίδης Σάββας Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 1-10-2014**

*«Μελέτη του λειτουργικού ρόλου της πρωτεΐνης Setb κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού-μοντέλου Danio rerio (zebrafish)»*

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 855/15-5-2018**

<b>Λεονάρδος Ιωάννης</b>	Καθηγητής Βιολογίας Ζώων με έμφαση στην Ιχθυολογία του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Παπαμαρκάκη Θωμαή</b>	Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Φριλίγγος Ευστάθιος</b>	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Φώτης Θεόδωρος</b>	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Πολίτου Αναστασία</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Χριστοφορίδης Σάββας</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπέης Δημήτριος</b>	Ερευνητής Γ' του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 25-5-2018

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μηνάς Πασχόπουλος**

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας





*Στην οικογένειά μου...*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (IMBB-ITE), κατά το χρονικό διάστημα 2014-2018, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Θωμαΐδος Παπαμαρκάκη.

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής κλείνει ένα πολύ σημαντικό κεφάλαιο της ζωής μου, κατά τη διάρκεια του οποίου μου δόθηκε η δυνατότητα να αποκτήσω σημαντικές γνώσεις και πολλές εμπειρίες. Είχα επίσης το προνόμιο να γνωρίσω και να συνεργαστώ με πολύ ικανά άτομα και τελικά μέσα από όλα αυτά να εξελιχτώ τόσο επιστημονικά όσο και ως άνθρωπος.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, οφείλω να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου σε όλους τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου τα τελευταία χρόνια. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθ. Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου και να εργαστώ σε ένα περιβάλλον με τις καλύτερες δυνατές συνθήκες. Ιδιαίτερα θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την συνεχή της καθοδήγηση, το ειλικρινές ενδιαφέρον και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου. Κυρίως όμως, γιατί με μύησε στην τέχνη της επιστήμης....!

Οφείλω να ευχαριστήσω επίσης, τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Λεονάρδο, μέλος της επταμελούς επιτροπής, για την εξαιρετική συνεργασία μας όσον αφορά τη μονάδα εκτροφής zebrafish. Ένα μεγάλο ευχαριστώ, θα ήθελα να απευθύνω και στον Δρ. Δημήτρη Μπέη, Ερευνητή Γ΄ του ΠΒΕΑΑ και μέλος της επταμελούς επιτροπής, ο οποίος με φιλοξένησε στο εργαστήριό του όπου είχα τη δυνατότητα να εκπαιδευτώ σε νέες τεχνικές και συνέβαλε ενεργά στην υλοποίηση σημαντικών πειραμάτων. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κατερίνα Σουψανά για τη συνεισφορά της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών και qPCR, όπως και τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Σαράντη για την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο του Δρ. Δ. Μπέη.

Στο διάστημα όλων αυτών των χρόνων στο εργαστήριο, είχα τη δυνατότητα και τη χαρά να συνεργαστώ πιο στενά με τρία άτομα τα οποία εκτιμώ ιδιαίτερος για το επίπεδό τους και την ποιότητα του χαρακτήρα τους. Θέλω λοιπόν, να ευχαριστήσω θερμά τη Ζωή Καρέτσου για την άψογη συνεργασία, τη βοήθεια και το αμείωτο ενδιαφέρον της καθόλη

την πορεία της εργασίας μου. Τις θερμότερες ευχαριστίες μου, θα ήθελα επίσης να εκφράσω στην Έλενα Τζίμα και την Πόπη Μουστάκα γιατί ήταν πάντα δίπλα μου και με στήριζαν, τόσο επαγγελματικά όσο και προσωπικά.

Θα ήθελα ακόμη, να ευχαριστήσω τα παρελθόντα και παρόντα μέλη του εργαστηρίου μου και συνολικά του εργαστηρίου της Βιολογικής Χημείας, όπως και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών (IMBB-BE), για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που είχε αναπτυχθεί μεταξύ μας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το εκφράσω στην οικογένεια μου και ειδικότερα στους γονείς μου.

**Σας ευχαριστώ, γιατί όλα αυτά τα χρόνια με στηρίζετε με κάθε τρόπο και μου δίνετε ώθηση να συνεχίσω. Είμαι υπερήφανη για εσάς και όσα έχετε καταφέρει.**

## Περιεχόμενα

---

<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</b>	<b>8</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>9</b>
<b>Η πρωτεΐνη SET</b>	<b>9</b>
1.1. Ταυτοποίηση της πρωτεΐνης SET	9
1.2. Δομικός χαρακτηρισμός της SET	9
1.3. Η SET ως ένα μόριο πολλών λειτουργιών	13
1.3.1. Ο ρόλος της SET στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης	13
1.3.2. Ο ρόλος της SET στη ρύθμιση της μεταγραφής	16
1.3.3. Ο ρόλος της SET στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση	18
1.3.4. Ο ρόλος της SET ως αναστολέας της Πρωτεϊνικής Φωσφατάσης 2A	20
1.3.5. Ο ρόλος της SET στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	23
1.3.6. Ο ρόλος της SET στην απόπτωση	24
1.3.7. Ο ρόλος της SET στην επιδιόρθωση του DNA	27
1.3.8. Ο ρόλος της SET στην κυτταρική μετανάστευση	29
1.4. Υποκυτταρικός εντοπισμός της SET: ο ρόλος της φωσφορυλίωσης	31
1.5. Η SET στο νευρικό σύστημα	35
1.6. Η SET στον καρκίνο	42
1.7. Η SET ως μόριο-στόχος φαρμάκων	43
1.7.1. COG112 (OP449)	44
1.7.2. Fingolimod (FTY720)	45
<b>Ο πρότυπος οργανισμός zebrafish (<i>Danio rerio</i>)</b>	<b>48</b>
2.1. Εδραίωση του zebrafish ως πειραματικό μοντέλο	48
2.2. Γενικές πληροφορίες	49
2.3. Φυσικό οικοσύστημα και γεωγραφική εξάπλωση	50
2.3. Συστηματική κατάταξη	50
2.4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά	51
2.5. Κύκλος ζωής και αναπαραγωγή	52
2.6. Εμβρυογένεση και πρόιμη ανάπτυξη	54
2.7. Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	59
2.7.1. Ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων	60
2.7.1.1. Οσφρητικό σύστημα	60
2.7.1.2. Σύστημα Πλευρικής Γραμμής	61
2.7.1.3. Ακουστικό-Αιθουσαίο σύστημα	63
2.7.1.4. Οπτικό σύστημα	64
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>67</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>69</b>
3.1. Εξοπλισμός και αναλώσιμα	69
3.1.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός	69
3.1.2. Χημικά αναλώσιμα και Διαλύματα	70

3.1.3.	Αντισώματα	73
3.2.	Μέθοδοι και τεχνικές	74
3.2.1.	Σύσταση και διατήρηση των πειραματικών πληθυσμών zebrafish	74
3.2.2.	Συλλογή και μονιμοποίηση zebrafish	75
3.2.3.	<i>In situ</i> υβριδισμός σε έμβρυα zebrafish (whole mount)	76
3.2.3.1.	Σχεδιασμός και σύνθεση των RNA ιχνηθετών	77
3.2.3.2.	Πρωτόκολλο <i>in situ</i> υβριδισμού	79
3.2.4.	Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε έμβρυα και προνύμφες zebrafish (whole mount)	82
3.2.5.	Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από έμβρυα zebrafish	84
3.2.6.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	85
3.2.7.	Ανοσοαποτύπωση Western	86
3.2.8.	Εργαλεία ανάδρομης γενετικής ανάλυσης	87
3.2.8.1.	Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης (MO)	88
3.2.8.2.	Σύστημα CRISPR-Cas9	90
3.3.	Απομόνωση ολικού RNA	96
3.4.	Ανάλυση μικροσυστοιχιών	97
3.5.	Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου	98
3.6.	Έκθεση εμβρύων zebrafish στο φάρμακο Fingolimod (FTY720)	99
3.7.	<i>In vivo</i> χρώση εμβρύων zebrafish με Acridine Orange	100
3.8.	<i>In vivo</i> χρώση των νευρομαστών με τη χρωστική FM1-43	100
3.9.	Στατιστική ανάλυση δεδομένων	101
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>		103
4.1.	Οι ορθόλογες πρωτεΐνες της SET, Seta και Setb στο zebrafish	103
4.1.1.	Σύγκριση των αλληλουχιών των Seta και Setb με την ανθρώπινη ορθόλογη και φυλογενετική ανάλυση	104
4.2.	Προσδιορισμός των προτύπων έκφρασης των γονιδίων <i>seta</i> και <i>setb</i> κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του zebrafish	106
4.3.	Προσδιορισμός των προτύπων έκφρασης των πρωτεϊνών Seta και Setb κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του zebrafish	109
4.4.	Εντοπισμός έκφρασης των πρωτεϊνών Seta και Setb στο σύστημα της πλευρικής γραμμής	112
4.4.1.	Εντοπισμός στα κροσσωτά κύτταρα των νευρομαστών	112
4.4.2.	Εντοπισμός στους στερεούς και τους κινητούς κροσσούς των νευρομαστών	114
4.5.	Μελέτη του φυσιολογικού ρόλου των γονιδίων <i>seta</i> και <i>setb</i> μέσω πειραμάτων καταστολής έκφρασης	116
4.5.1.	Μελέτη των επιπτώσεων καταστολής της έκφρασης των γονιδίων <i>seta</i> και <i>setb</i> μέσω μικροέγχυσης αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης	116
4.5.2.	Καταστολή της έκφρασης του γονιδίου <i>setb</i> μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9	122
4.5.3.	Μελέτη της επίδρασης της καταστολής έκφρασης των πρωτεϊνών Seta/b στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση	124
4.5.4.	Μελέτη της επίδρασης της καταστολής των <i>seta/b</i> στο έσω ους	128
4.5.5.	Μελέτη της επίδρασης της καταστολής έκφρασης των γονιδίων <i>seta</i> και <i>setb</i> στους νευρομαστούς της πλευρικής γραμμής	130
4.6.	Φαρμακολογική αναστολή της δράσης των Seta/b	133



4.6.1.	Ανάλυση της επίδρασης του φαρμάκου FTY720, στην πρόωμη ανάπτυξη του zebrafish	133
4.6.2.	Ανάλυση της επίδρασης του φαρμάκου FTY720 στην ανάπτυξη των νευρομαστών της πλευρικής γραμμής	135
4.7.	Ανάλυση του μεταγραφώματος των <i>seta/b</i> morphants	138
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>		<b>145</b>
	Τα ορθόλογα γονίδια του <i>SET</i> , στο zebrafish	145
	Ανάλυση προτύπου έκφρασης των γονιδίων <i>seta/b</i> κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του zebrafish	147
	Επιπτώσεις της καταστολής των γονιδίων <i>seta/b</i> στην εμβρυογένεση	149
	Επιπτώσεις της καταστολής των γονιδίων <i>seta/b</i> στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των εμβρύων	153
	Η σημασία της έκφρασης των <i>Seta/b</i> στα αισθητήρια όργανα του οργανισμού zebrafish	159
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>		<b>163</b>
<b>SUMMARY</b>		<b>165</b>
<b>ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ</b>		<b>167</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>		<b>173</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b>		<b>193</b>
	Παράρτημα 1	193
	Παράρτημα 2	197
	Παράρτημα 3	199
	Παράρτημα 4	201

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>aLL</b>	Anterior Lateral Line (Εμπρόσθια πλευρική γραμμή)
<b>bHLH</b>	basic Helix-Loop-Helix
<b>Cas9</b>	CRISPR-Associated 9
<b>CBP</b>	CREB (cyclic AMP response element binding protein) Binding Protein
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>CRISPR</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
<b>CRM1</b>	Chromosome Region Maintenance 1 (Υποδοχέας πυρηνικής εξόδου 1)
<b>dpf</b>	days post fertilization (ημέρες μετά τη γονιμοποίηση)
<b>FC</b>	Fold Change (Διαφορά έκφρασης)
<b>gRNA</b>	guide RNA (οδηγό RNA)
<b>GzmA</b>	Granzyme A (Σερينوπρωτεάση Κυτταροτοξικών κοκκίων)
<b>hpf</b>	hours post fertilization (ώρες μετά τη γονιμοποίηση)
<b>I2PP2A</b>	Inhibitor 2 of PP2A (Αναστολέας 2 της Πρωτεϊνικής Φωσφατάσης 2A)
<b>INHAT</b>	Inhibitor of Histone Acetyltransferases (Σύμπλοκο αναστολής των ακετυλοτρανσφερασών των ιστονών)
<b>MHB</b>	Midbrain Hindbrain Boundary (Όριο μεσεγκεφάλου – οπίσθιου εγκεφάλου)
<b>MO</b>	Morpholino Oligonucleotides (Αντινοηματικά ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης)
<b>NAPI</b>	Nucleosome Assembly Protein I
<b>PCAF</b>	p300/CBP Associated Factor
<b>PFA</b>	Παραφορμαλδεΐδη
<b>pH3</b>	phospho- histone 3
<b>pLL</b>	posterior Lateral Line (Οπίσθια πλευρική γραμμή)
<b>PP2A</b>	Protein Phosphatase 2A (Πρωτεϊνική Φωσφατάση 2A)
<b>qPCR</b>	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου)
<b>RGCL</b>	Retinal Ganglion Cell Layer (Στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς)
<b>RPE</b>	Retinal Pigment Epithelium (Μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς)
<b>SET</b>	SE Translocation
<b>TAF-I</b>	Template Activating Factor I

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## Η πρωτεΐνη SET

### 1.1. Ταυτοποίηση της πρωτεΐνης SET

Η ανακάλυψη του γονιδίου *SET* έγινε το 1992, στα πλαίσια μελετών χρωμοσωμικών μεταθέσεων σε διαφόρους τύπους λευχαιμίας (von Lindern *et al.*, 1992). Ανιχνεύθηκε ως προϊόν σύντηξης με το ογκογονίδιο *CAN* (*NUP214*) σε κύτταρα μυελού των οστών που είχαν απομονωθεί από ασθενή (S.E) ο οποίος έπασχε από Οξεία Αδιαφοροποίητη Λευχαιμία, ως εκ τούτου το νέο γονίδιο ονομάστηκε *SET* (*SE Translocation*). Στα πλαίσια ανεξάρτητης έρευνας ταυτοποιήθηκε ως παράγοντας έναρξης της αντιγραφής του DNA του Αδενοϊού (Template Activating Factor I, TAFI). Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του TAFI ανέδειξε την ύπαρξη δύο πολυπεπτιδίων μεγεθών 41 kDa (TAF-Iα, 290 αα) και 39 kDa (TAF-Iβ, 277 αα). Περαιτέρω ανάλυση σε επίπεδο νουκλεοτιδίων αποκάλυψε πως οι TAF-Iα και TAF-Iβ κωδικοποιούνται από το γονίδιο *SET* και πως απόλυτη ομοιότητα με την πρωτεΐνη SET έφερε μόνο η ισομορφή TAF-Iβ (SET/TAF-Iβ, 39 kDa) καθώς η TAF-Iα διέφερε ως προς το αμινοτελικό της άκρο (Nagata *et al.*, 1995).

### 1.2. Δομικός χαρακτηρισμός της SET

Οι μελέτες των von Lindern *et al.* (1992), Matsumoto *et al.* (1993), Vaesen *et al.* (1994), Nagata *et al.* (1995) και Li *et al.* (1996a) υπήρξαν καθοριστικές στην ανακάλυψη του γονιδίου *SET* και του προϊόντος που αυτό κωδικοποιεί, αποκαλύπτοντας ταυτόχρονα πιθανούς ρόλους της πρωτεΐνης SET. Τα πρώτα αποτελέσματα από την κλωνοποίηση των αντίστοιχων, στην κάθε μελέτη, μορίων cDNA έδειξαν ότι πρόκειται για αλληλουχίες με υψηλό ποσοστό αρνητικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων τα οποία σχηματίζουν μια μακριά όξινη καρβοξυτελική ουρά.

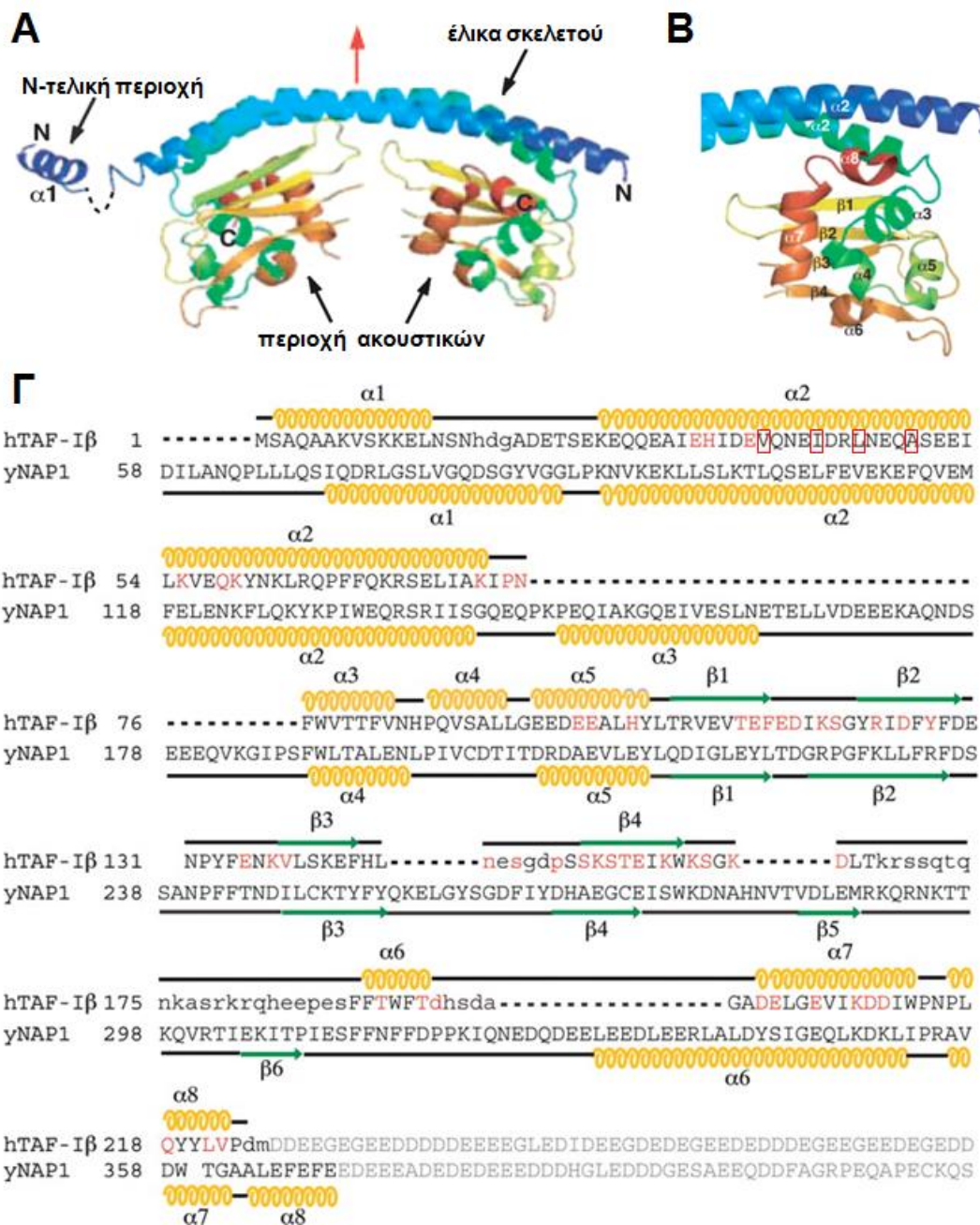
Χαρακτηριστική είναι ακόμη η υψηλή ομολογία της SET με την πρωτεΐνη NAPI (Nagata *et al.*, 1995; von Lindern *et al.*, 1992) η οποία ως μόριο-συνοδός των ιστονών

είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά και σύνδεσή τους στο DNA συμβάλλοντας στη συναρμολόγηση του νουκλεοσώματος (Park and Luger, 2006b). Το γεγονός ότι η NAPI μπορεί να υποκαθιστά την ενεργότητα της TAFI στην έναρξη της αντιγραφής και μεταγραφής του γονιδιώματος του αδενοϊού (Ad core) αποδεικνύει ότι πρόκειται για δομικά και λειτουργικά ομόλογες πρωτεΐνες (Kawase *et al.*, 1996).

Βασιζόμενοι στα παραπάνω ευρήματα και προκειμένου να κατανοήσουν καλύτερα τους μηχανισμούς που διέπουν τη δράση της SET/TAFIβ, ο Muto και οι συνεργάτες του προχώρησαν στον δομικό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης μέσω προσδιορισμού της κρυσταλλικής της δομής. Στοχεύοντας στην εύρεση των δομικών περιοχών που μεσολαβούν τη δράση της SET/TAFIβ ως συνοδού ιστονών και λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία της ύπαρξης όξινων περιοχών σε πρωτεΐνες με αντίστοιχη δράση, κατασκεύασαν μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη από την οποία απουσίαζε η όξινη καρβοξυτελική περιοχή (SET/TAFIβΔC). Χρησιμοποιώντας το μετάλλαγμα SET/TAFIβΔC σε πειράματα αλληλεπίδρασης με τις πυρηνικές ιστόνες, διαπίστωσαν ότι η SET συνδέεται επιλεκτικά με τις ιστόνες H3 και H4 επιβεβαιώνοντας πως η όξινη C-περιοχή δεν συμμετέχει σε αυτήν την λειτουργία. Ως εκ τούτου πραγματοποίησαν ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της SET/TAFIβΔC (Muto *et al.*, 2007).

Βάσει των κρυσταλλογραφικών δεδομένων προκύπτει ότι η πρωτεΐνη σχηματίζει ένα συμμετρικό διμερές, υιοθετώντας ένα σχήμα που μοιάζει με ακουστικά. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μία N-τελική περιοχή (αμινοξέα 1-24), μία μακριά α2-έλικα του κορμού της πρωτεΐνης (backbone) (αμινοξέα 25-78) και μια περιοχή σχήματος ακουστικού (earmuff domain) (αμινοξέα 79-225). Ειδικότερα, τα πρώτα αμινοξέα της N-τελικής ουράς (που διαφέρουν μεταξύ των ισομορφών TAFIα και TAFIβ), σχηματίζουν μία α1-έλικα η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή κινητικότητα. Όσον αφορά το N-τελικό άκρο της TAFIα, η ύπαρξη δέκα καταλοίπων προλίνης (αμινοξέα 1-37) δεν συνάδει με την αναμενόμενη αμινοξική σύσταση δομής α-έλικας και πιθανόν λειτουργεί αποτρεπτικά στο σχηματισμό της. Οι μακριές α2-έλικες των δύο υπομονάδων είναι τοποθετημένες στο διμερές με αντιπαράλληλο τρόπο και αλληλεπιδρούν μέσω υδροφοβικότητας, όπως αντίστοιχα συμβαίνει και στη NAPI (Εικόνα 1.1A,Γ). Η τρίτη περιοχή που φέρει σχήμα ακουστικού, έχει δομή α+β και αποτελείται από 6 α-έλικες τοποθετημένες πάνω σε β-πτυχωτά φύλλα τεσσάρων κλώνων με αντιπαράλληλο προσανατολισμό (Εικόνα 1.1B).

Τα παραπάνω δομικά χαρακτηριστικά της SET έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη στην οποία διερευνήθηκε εκτενώς ο διμερισμός της πρωτεΐνης TAFI (TAFIα, TAFIβ) με την αξιοποίηση βιοχημικών μεθόδων όπως χημική διασύνδεση, αποδιάταξη-επαναδιάταξη πρωτεϊνών, *in situ* μεταλλαξιγένεση καθώς και εργαλείων βιοπληροφορικής για την *in silico* πρόβλεψη δευτεροταγών δομών. Σύμφωνα με αυτά οι πρωτεΐνες TAFIα, TAFIβ σχηματίζουν όμο- ή ετεροδιμερή και η περιοχή που ευθύνεται για τον διμερισμό βρίσκεται στο κοινό N-τελικό τους άκρο. Με τη χρήση κατάλληλου αλγορίθμου εξετάστηκε η πιθανότητα σχηματισμού δομής σπειρωμένου σπειράματος (coiled-coil), καθώς αυτή αποτελεί μία βασική διαμόρφωση για τη δημιουργία διμερών. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε πως η αμινοξική περιοχή 25-65 της TAFIβ μπορεί να λάβει τέτοια διαμόρφωση μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο α-ελίκων. Πράγματι, η αντικατάσταση επιλεγμένων υδρόφοβων αμινοξέων με υδρόφιλα (Εικόνα 1.1Γ, εντός κόκκινου πλαισίου) ήταν αρκετή για να αποτρέψει το σχηματισμό διμερούς, επιβεβαιώνοντας την αρχική πρόβλεψη (Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 1999).



**Εικόνα 1.1.** Κρυσταλλογραφική δομή της πρωτεΐνης SET/TAF1BAC. (A) Η SET/TAF1BAC σχηματίζει διμερές και αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές: την ευκίνητη αμινοτελική περιοχή, την έλικα σκελετού (περιοχή διμερισμού) και την περιοχή ακουστικού (με κόκκινο βέλος υποδεικνύεται ο άξονας συμμετρίας). (B) Η δομική περιοχή ακουστικού αποτελείται από α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα (PDB ID: 2E50). (Γ) Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της ανθρώπινης TAF1B και της NAP1 της ζύμης. Προβολή των δευτεροταγών δομών με βάση την κρυσταλλογραφική ανάλυση των Muto *et al.* (2007).

### 1.3. Η SET ως ένα μόριο πολλών λειτουργιών

Σύμφωνα με πλήθος μελετών η SET:

- > συμμετέχει στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης,
- > δρα ως συνοδός ιστονών,
- > συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής,
- > συμμετέχει στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση,
- > δρα ως ισχυρός αναστολέας της Πρωτεϊνικής Φωσφατάσης 2A,
- > συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου,
- > συμμετέχει στην αποπτωτική διαδικασία,
- > συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και
- > συμβάλλει στην κυτταρική μετανάστευση.

#### 1.3.1. Ο ρόλος της SET στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης

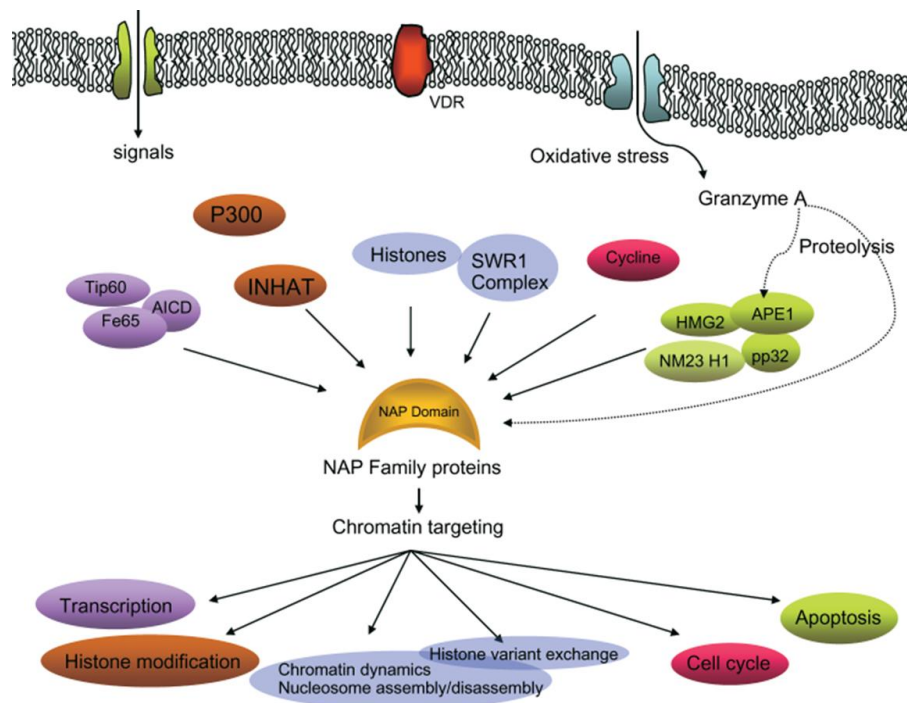
Η δομή της χρωματίνης αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο του μηχανισμού ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης καθώς ανάλογα με το βαθμό συμπύκνωσης κατατάσσεται σε ευχρωματίνη ή ετεροχρωματίνη, δηλαδή αποκτά μία διαμόρφωση μεταγραφικά ενεργή ή ανενεργή αντίστοιχα. Καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης διαδραματίζουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών τις οποίες καταλύουν κατάλληλα τροποποιητικά ένζυμα, οι ATP-εξαρτώμενοι παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης καθώς και μόρια-συνοδοί ιστονών (Mellor, 2005).

Λόγω του θετικού τους φορτίου, υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι ιστόνες τείνουν να αλληλεπιδράσουν με το DNA σχηματίζοντας συσσωματώματα. Προς αποφυγή αυτού οι συνοδοί ιστονών συνδέονται με τις ελεύθερες ιστόνες παρεμποδίζοντας μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις με το DNA και εξασφαλίζοντας έτσι τη σωστή συναρμολόγηση του νουκλεοσώματος (Eitoku *et al.*, 2008; Keck and Pemberton, 2012).

#### *H SET ως συνοδός ιστονών*

Η οικογένεια πρωτεϊνών NAP αποτελείται από πλήθος μελών -ομόλογων της NAPI- σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Κοινά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια είναι η ύπαρξη της εξελικτικά συντηρημένης δομικής

περιοχής NAP και της όξινης καρβοξυτελικής ουράς, η αμινοξική σύσταση της οποίας έχει δειχθεί ότι είναι εξίσου συντηρημένη. Μέσω αυτών των περιοχών, οι πρωτεΐνες NAP αλληλεπιδρούν τόσο με τη χρωματίνη όσο και με πλήθος ρυθμιστικών παραγόντων παρεμβαίνοντας έτσι σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διαδικασιών (Εικόνα 1.2) (Park and Luger, 2006a).



**Εικόνα 1.2.** Μέσω της δομικής περιοχής NAP, οι πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια συνδέονται με διάφορους ρυθμιστικούς παράγοντες και αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη επηρεάζοντας ένα σύνολο κυτταρικών διαδικασιών (Park and Luger, 2006a).

Η SET/TAFIβ είναι ένα από τα πλέον καλά χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών NAP. Βιοχημικά πειράματα έδειξαν πως η TAFI μπορεί να υποκαταστήσει την NAPI στη συναρμολόγηση της χρωματίνης *in vitro* (Kawase *et al.*, 1996), ενώ από την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της SET διαπιστώθηκε ότι οι δύο πρωτεΐνες (SET και NAPI) εμφανίζουν παρόμοια αναδίπλωση (Muto *et al.*, 2007). Ως εκ τούτου η σημαντική ομολογία που εμφανίζει η SET με την NAPI, δεν περιορίζεται μόνο σε επίπεδο αλληλουχίας αλλά επεκτείνεται και σε αυτό της λειτουργίας, εντάσσοντας την πρώτη σε ένα σύνολο μορίων τα οποία χαρακτηρίζονται από λειτουργική ποικιλομορφία.

Από τις πρώτες κιόλας μελέτες ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού της SET/TAFIβ υπήρχαν ενδείξεις ενεργότητας συνοδού ιστονών καθώς είχε βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τις



βασικές ικές πρωτεΐνες του νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου του Αδενοϊού (Nagata *et al.*, 1995). Επιπλέον, είχεδειχθεί ότι μεσολαβεί την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης σπερματικών κυττάρων του *Xenopus* μέσω σύνδεσης και απομάκρυνσης των βασικών πρωτεϊνών που είναι προσδεδεδεμένες σε αυτή (Matsumoto *et al.*, 1999a; Matsumoto *et al.*, 1999b). Η αλληλεπίδραση της SET με τις ιστόνες έχει επιβεβαιωθεί τόσο *in vitro* (Okuwaki and Nagata, 1998) όσο και *in vivo* (Seo *et al.*, 2001). Η SET/TAFΙβ μπορεί να συνδεθεί με όλες τις ιστόνες του νουκλεοσώματος ωστόσο εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια προς τις ιστόνες H3/H4. Σημαντική ήταν η αποκάλυψη των δομικών περιοχών που ευθύνονται για τις αλληλεπιδράσεις με τις ιστόνες. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η SET αποτελείται από μία N-τελική περιοχή ειδική των ισομορφών TAFΙα (αα 1-37)/TAFΙβ (αα 1-24), από την περιοχή διμερισμού, την περιοχή σχήματος ακουστικού ή NAP και την όξινη C-τελική περιοχή. Βρέθηκε ότι απουσία του καρβοξυτελικού τμήματος, η SET/TAFΙβΔC αλληλεπιδρά μόνο με τις ιστόνες H3/H4, ενώ βιοχημικά πειράματα με τη χρήση μεταλλαγμάτων της SET/TAFΙβ έδειξαν πως απαραίτητο για τη σύνδεση με τις ιστόνες είναι το κατώτερο τμήμα της περιοχής ακουστικού/NAP (Karetsou *et al.*, 2009; Muto *et al.*, 2007). Επιπλέον, η SET έχει ταυτοποιηθεί ως μοριακός συνοδός της συνδετικής ιστόνης H1, η οποία πιθανά παρεμβαίνει στη σύνδεση της H1 με το συνδετικό DNA και κατ' επέκταση συμμετέχει στη ρύθμιση της πλαστικότητας της χρωματίνης (Kato *et al.*, 2011). Μάλιστα, πρόσφατη έρευνα έδειξε πως κατά τη μίτωση η SET συνδέεται στη φωσφορυλιωμένη ιστόνη H1 (H1S/T18ph) η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των αδελφών χρωματίδων στην πρόφαση, και την απομακρύνει διευκολύνοντας το διαχωρισμό τους (Krishnan *et al.*, 2017).

### ***Ο ρόλος της SET στην τροποποίηση των ιστονών***

Πέραν των συνοδών των ιστονών, η οργάνωση της χρωματίνης ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα στις ουρές των ιστονών του οκταμερούς, οι οποίες προεξέχουν από το νουκλεόσωμα. Τέτοιες τροποποιήσεις είναι η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η φωσφορυλίωση, η ουβικιτινυλίωση και η ADP-ριβοσυλίωση.

Η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης των ιστονών είναι από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες τροποποιήσεις που σχετίζονται με την μεταγραφικά ενεργή χρωματίνη (Hansen *et al.*, 2010). Η SET ως υπομονάδα του συμπλόκου αναστολής των

ακετυλοτρανσφερασών, INHAT (Inhibitor of Histone Acetyltransferases Complex), αναστέλλει την ακετυλίωση των ιστονών μέσω ενός μηχανισμού κάλυψης γνωστού ως “histone masking” (Seo *et al.*, 2001). Το σύμπλοκο INHAT αποτελείται από τρεις βασικές υπομονάδες που συνιστούν οι πρωτεΐνες SET/TAF1β (39 kDa), TAF1α (41 kDa) και pp32 (32 kDa), με την τελευταία να ανήκει στην οικογένεια όξινων πυρηνικών φωσφοπρωτεϊνών, πλούσιων σε κατάλοιπα λευκίνης (leucine-rich). Το εν λόγω σύμπλοκο αναστέλλει την δράση των ακετυλοτρανσφερασών των ιστονών p300/CBP και PCAF μέσω σύνδεσής του με τις ιστόνες. Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα οι πρωτεΐνες pp32 και SET/TAF1β αλληλεπιδρούν με την N-τελική ουρά της νεοσυντιθέμενης ιστόνης H4 και εμποδίζουν την ακετυλίωσή της, αποτρέποντας την πρόσβαση της ακετυλοτρανσφεράσης HAT1 στα κατάλοιπα Λυσίνης (Saavedra *et al.*, 2017).

Η SET/TAF1β, ως μέλος του INHAT, μπορεί να προσδεθεί ειδικά στις ιστόνες όταν είναι υποακετυλιωμένες ή φέρουν κατασταλτικές τροποποιήσεις (Kutney *et al.*, 2004) αλλά δεν συνδέεται σε αυτές όταν οι ουρές τους παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ακετυλίωσης (Schneider *et al.*, 2004). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι η SET/TAF1β επιδρά στη διαμόρφωση της χρωματίνης μέσω ρύθμισης των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και αναδεικνύουν έναν νέο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής.

### **1.3.2. Ο ρόλος της SET στη ρύθμιση της μεταγραφής**

Η αναδιοργάνωση της χρωματινικής δομής από μια κατάσταση υψηλού βαθμού συμπύκνωσης σε μια πιο χαλαρή, καθιστά δυνατή την πρόσβαση και σύνδεση στο DNA μεταγραφικών παραγόντων και άλλων πρωτεϊνών που ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση. Η πρωτεΐνη SET έχει ενεργό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής του DNA γιατί ως συνοδός ιστονών επιδρά στη διαμόρφωση της χρωματίνης ενώ παράλληλα επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων αλληλεπιδρώντας με παράγοντες μεταγραφής.

Ως υπομονάδα του συμπλόκου INHAT, η SET συμβάλλει στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης καθώς αναστέλλει τη δράση των ακετυλοτρανσφερασών p300/CBP και PCAF (Seo *et al.*, 2001). Η δράση των δύο αυτών ενζύμων σε σχέση με την ενεργοποίηση της μεταγραφής είναι διττή εφόσον αφενός καταλύουν την προσθήκη ακετυλο-ομάδων σε κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών και οδηγούν στην αποσυμπύκνωση

της χρωματίνης και αφετέρου συνδέονται με μεταγραφικούς παράγοντες και στρατολογούν στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου-στόχου τη βασική μεταγραφική μηχανή, λειτουργώντας ως συνενεργοποιητές.

Στόχοι ακετυλίωσης της p300 είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες Sp/KLF οι οποίοι ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων zinc finger δομής, με ρόλους στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την ογκογένεση. Έχει δειχθεί ότι η σύνδεση της SET με τον παράγοντα KLF5 (Krüppel-Like Factor 5) παρεμποδίζει την ενεργοποίησή του από την p300 και αποτρέπει την πρόσδεσή του στο DNA, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην αρνητική ρύθμιση της μεταγραφικής του ενεργότητας (Miyamoto *et al.*, 2003). Ομοίως συμβαίνει και στην περίπτωση του παράγοντα Sp1, καθώς η αλληλεπίδρασή του και με τις δύο ισομορφές SET/TAFIIβ και TAFIIα αποτρέπει την πρόσβασή του στο DNA καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Suzuki *et al.*, 2003). Κάποιες ακόμη περιπτώσεις αρνητικής ρύθμισης της μεταγραφής αφορούν στην αλληλεπίδραση της SET με πυρηνικούς υποδοχείς που φέρουν μεταγραφική ενεργότητα όπως ο υποδοχέας του Ρετινοϊκού Οξέος, (Seo *et al.*, 2001) και ο υποδοχέας οιστρογόνων ERα (Loven *et al.*, 2003) όπως και με την πρωτεΐνη THAP7 (Thanatos Associated Protein 7) η οποία αναστέλλει την ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 (Macfarlan *et al.*, 2006).

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η δράση της SET σε σχέση με την p53, ένα μόριο με ογκοκατασταλτική δράση. Η p53 ως απόκριση σε μηνύματα κυτταρικού stress ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων-στόχων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. Απαραίτητη γι' αυτή την ενεργότητα της p53 είναι η ακετυλίωση της από τις p300/CBP και PCAF. Η SET καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα της p53 τόσο παρεμποδίζοντας τη δράση των ακετυλοτρανσφερασών ως μέλος του συμπλόκου INHAT, όσο και με την άμεση αλληλεπίδρασή της με το C-τελικό τμήμα της p53 όπου υφίσταται τις τροποποιήσεις (Wang *et al.*, 2016). Ένας ακόμη στόχος της SET είναι ο FoxO1, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων FoxO που ευθύνονται για την ενεργοποίηση γονιδίων σχετικών με τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση και την επιδιόρθωση DNA. Η SET έχει δειχθεί ότι σε συνθήκες οξειδωτικού stress αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του FoxO1 μέσω παρεμπόδισης της ακετυλίωσής του από τις p300/PCAF (Chae *et al.*, 2014).

Ειδικότερα όσον αφορά τη ρύθμιση της μεταγραφής στο νευρικό σύστημα η SET αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική περιοχή του μεταγραφικού παράγοντα LHX3 (LIM

Homeobox 3) και οδηγεί στη μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και λειτουργία της υπόφυσης (Hunter *et al.*, 2013). Αντίθετα στην περίπτωση του κυτοχρώματος P450c17, η SET προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου και μαζί με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες προωθεί τη μεταγραφή του. Αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η δράση του ενζύμου P450c17 στη βιοσύνθεση της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA), η οποία είναι απαραίτητη για την σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του νευρικού συστήματος (Compagnone *et al.*, 2000).

Αν και στις περισσότερες μελέτες που αφορούν τη μεταγραφική ρύθμιση έχει δοθεί έμφαση στη δράση της SET ως αναστολέα της ακετυλίωσης, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι μέσω του συμπλόκου INHAT η SET επιδρά και στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA αποτρέποντας την πρόσβαση σε απομεθυλάσες οδηγώντας έτσι στην υπερμεθυλίωσή του και την καταστολή της μεταγραφής (Cervoni *et al.*, 2002).

Τέλος, έχει δειχθεί πως η SET αλληλεπιδρά με την ProTa (Prothymosin  $\alpha$ ), μία μικρή όξινη πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με την ιστόνη H1 και προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης σε ανθρώπινα σπερματικά κύτταρα. Η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ SET και ProTa προωθεί τη δράση του συνενεργοποιητή CBP και προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (Karetsou *et al.*, 2004). Αντίστοιχα, η άμεση αλληλεπίδραση της SET με την CBP ενισχύει την ενεργότητα της τελευταίας ως συνενεργοποιητή, συμβάλλοντας έτσι στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (Karetsou *et al.*, 2005).

### **1.3.3. Ο ρόλος της SET στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση**

Ένας εκ των μηχανισμών που χρησιμοποιούν τα ευκαρυωτικά κύτταρα για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αφορά στην αποικοδόμηση του mRNA. Ο ρυθμός αποικοδόμησης του mRNA διαμορφώνεται με βάση εξωτερικά ερεθίσματα έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στις ανάγκες του κυττάρου σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων της αλληλουχίας των mRNAs με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που συνδέονται στο RNA και αναγνωρίζουν αυτά τα στοιχεία, είναι υπεύθυνες για τη γονιδιακή ρύθμιση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα *cis*-στοιχεία ανήκουν στην οικογένεια των στοιχείων πλούσιων σε αλληλουχίες AU (AU-rich elements, AREs) που βρίσκονται στην 3' αμετάφραστη

περιοχή (3' UTR) πολλών μεταγραφημάτων. Ο ρυθμιστικός ρόλος των AREs στη σταθερότητα ή/και τη μετάφραση του mRNA είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τη δράση πρωτεϊνών πρόσδεσης στα AREs (ARE-binding proteins, ARE-BPs) και την επαγόμενη ή μη αποαδενυλίωσή του (Wu and Brewer, 2012).

Η HuR (ELAVL1) είναι μία καλά μελετημένη ARE-συνδεόμενη πρωτεΐνη, η οποία είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση των mRNAs. Χαρακτηρίζεται από πυρηνικό κυρίως εντοπισμό ωστόσο μετακινείται και στο κυτταρόπλασμα όπου πιθανολογείται ότι συμβάλλει στη μεταφορά των μορίων mRNA και την προστασία τους από τη μηχανή αποικοδόμησης. Ο μηχανισμός διατήρησης της σταθερότητας των μορίων mRNA πιθανά μεσολαβείται και από την αλληλεπίδραση των ARE-συνδεόμενων πρωτεϊνών με άλλους παράγοντες. Κατά την αναζήτηση τέτοιων μορίων βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες SET/TAFIβ, TAFIα, pp32 (ANP32A) και APRIL (ANP32B) αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη HuR και συμβάλλουν στη δράση της σε σχέση με τη σταθεροποίηση του mRNA (Brennan *et al.*, 2000). Οι τέσσερις πρωτεΐνες είναι δομικά όμοιες και αρκετά όξινες λόγω της σύστασης των καρβοξυτελικών τους περιοχών με ισοηλεκτρικά σημεία 4.12, 4.23, 3.99 και 3.94 αντίστοιχα. Επιπλέον, για τις τρεις πρώτες είναι γνωστό ότι συνιστούν υπομονάδες του συμπλόκου INHAT (Seo *et al.*, 2001), όπως και ότι είναι αναστολείς της PP2A (Li *et al.*, 1996a, b).

Πλήθος γονιδίων μέσω των μηχανισμών εναλλακτικού ματίσματος και πολυαδενυλίωσης παράγουν μετάγραφα RNA τα οποία διαφέρουν ως προς το μήκος της 3'-αμετάφραστης περιοχής ενώ κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη. Μολονότι από τις διαφορετικές 3'UTR ισομορφές προκύπτει το ίδιο προϊόν, σημαντικές είναι οι διαφορές που αφορούν τη σύστασή τους σε *cis*- ρυθμιστικά στοιχεία, τα οποία ευθύνονται τόσο για τον εντοπισμό του mRNA όσο και για τα επίπεδα της πρωτεΐνης. Πρόσφατη μελέτη παρουσιάζει έναν μηχανισμό κατευθυνόμενης μετακίνησης πρωτεϊνών στις μεμβράνες, εξαρτώμενο από τις 3'UTR περιοχές (3'UTR-dependent protein localization, UDPL) ο οποίος σχετίζεται με την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών SET και HuR. Συγκεκριμένα στον προτεινόμενο μηχανισμό η πρωτεΐνη HuR προσδένεται μόνο στη μεγάλη αλυσίδα 3'UTR ενός μεταγράφου και όχι στην μικρή, όπου στρατολογεί την SET. Κατόπιν μετακίνησης του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου στην επιφάνεια του Ενδοπλασματικού δικτύου, η 3'UTR περιοχή δρα ως ικρίωμα και κατευθύνει τη SET στην περιοχή μετάφρασης. Η SET παραμένει συνδεδεμένη στην C-τελική περιοχή της



πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την κυτταρική κίνηση, τη δυναμική του κυτταροσκελετού, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και τη ρύθμιση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών, ενώ πλήθος μελετών έχει αναδείξει το ρόλο της ως ογκοκατασταλτικό μόριο (Janssens and Goris, 2001). Η PP2A απαντάται σε δύο μορφές: ως κεντρικό διμερές ένζυμο (core) ή ως τριμερές ολοένζυμο. Το διμερές ένζυμο αποτελείται από την δομική υπομονάδα A ή PR65 (scaffold, 36 kDa) και την καταλυτική υπομονάδα C (65 kDa). Ο σχηματισμός του ολοενζύμου προκύπτει από την προσθήκη μιας ακόμη ρυθμιστικής υπομονάδας B στο κεντρικό διμερές. Υπάρχουν τέσσερις οικογένειες της ρυθμιστικής υπομονάδας B. Κάθε μία εκ των οικογενειών αυτών αποτελείται από 2-5 ισομορφές προβλέποντας περισσότερους από 80 διαφορετικούς συνδυασμούς για το σχηματισμό του ολοενζύμου PP2A (Sangodkar *et al.*, 2016). Οι διαφορετικές ρυθμιστικές υπομονάδες προσδίδουν στο ολοένζυμο εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα.

Η ρύθμιση της ενεργότητας της PP2A επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό και από την τροποποίηση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων της καταλυτικής υπομονάδας. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η μεθυλίωση της λευκίνης L309 η οποία συμβάλλει θετικά στην ενεργότητα του ενζύμου (Favre *et al.*, 1994). Αντίθετα η φωσφορυλίωση της τυροσίνης Y307 (Tyr307) και της θρεονίνης T304 παρεμποδίζουν τον σχηματισμό του ολοενζύμου και αναστέλλουν τη δράση της φωσφατάσης (Chen *et al.*, 1992; Guo and Damuni, 1993; Sangodkar *et al.*, 2016).

Ένας ακόμη μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητας της PP2A αφορά στην αλληλεπίδραση του ενζύμου με ενδογενείς αναστολές, μόρια δηλαδή που προσδέονται στην καταλυτική υπομονάδα και παρεμποδίζουν τη δράση του. Στα πλαίσια αναζήτησης πρωτεϊνών με τέτοια δράση απομονώθηκαν από εκχυλίσματα νεφρού βοός δύο θερμοσταθερές πρωτεΐνες με δράση αναστολέα ειδική έναντι της PP2A, οι I1PP2A και I2PP2A. Οι δύο πρωτεΐνες δρουν με μη ανταγωνιστικό τρόπο και η δράση τους χαρακτηρίζεται με σταθερές αναστολής  $K_i$  της τάξης του nanomolar (Li *et al.*, 1995). Περαιτέρω πειράματα χαρακτηρισμού των δύο αναστολέων έδειξαν ότι η I1PP2A ταυτοποιείται ως η PHAPI (ή pp32) και η I2PP2A ως η πρωτεΐνη SET/TAFIβ (Li *et al.*, 1996b, a).

### *Δομικές περιοχές που διαμεσολαβούν την αλληλεπίδραση SET/PP2A*

*In vitro* πειράματα με ανασυνδυασμένα τμήματα της SET έδειξαν ότι το τμήμα της πρωτεΐνης που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση των δύο μορίων εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο μεταξύ των αμινοξέων 25-119, μία περιοχή η οποία είναι κοινή στις δύο ισομορφές TAF1α και SET/TAF1β και εμπεριέχει την περιοχή διμερισμού (αα 25-65). Επομένως η PP2A αναστέλλεται και από τις δύο ισομορφές άμεσα χωρίς να είναι απαραίτητος ο διμερισμός τους (Saito *et al.*, 1999). Επιπλέον μελετήθηκε η συνεισφορά της C-τελικής περιοχής στη σύνδεση της SET στην PP2A αλλά και στην δυνατότητα αναστολής της φωσφατάσης. Η χρήση μεταλλαγμάτων από τα οποία απουσίαζε η καρβοξυτελική περιοχή [TAF1αΔC3 (1-238), TAF1αΔC5 (1-132), TAF1βΔC3 (1-225) και TAF1βΔC5 (1-119)] έδειξε ότι στην περίπτωση της TAF1β η ενεργότητα αναστολέα διατηρείται ενώ στην TAF1α μειώνεται, υποδεικνύοντας πιθανό αρνητικό ρόλο στην αναστολή της PP2A άμεσα σχετιζόμενο με το N-τελικό άκρο στο οποίο οι δυο ισομορφές διαφέρουν. Δεδομένου ότι μέρος της αμινοξικής περιοχής 25-119 ευθύνεται για τον σχηματισμό διμερούς, εξετάστηκε κατά πόσον είναι απαραίτητος ο διμερισμός της πρωτεΐνης για την αποτελεσματική αναστολή της φωσφατάσης. Με τη χρήση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TAF1βPME (όπου υδρόφοβα αμινοξέα που εμπλέκονται στο διμερισμό έχουν αντικατασταθεί από υδρόφιλα) διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη εξακολουθεί να αναστέλλει την PP2A και ως μονομερές (Saito *et al.*, 1999).

Πιο πρόσφατες μελέτες, χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα εγκεφάλου αρουραίου, έδειξαν ότι η SET συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα της PP2A (PP2A<sub>C</sub>) και πως το αμινοξύ Val92 είναι απαραίτητο τόσο στη σύνδεση των δύο μορίων όσο και στην αναστολή της PP2A (Arnaud *et al.*, 2011). Τέλος, η ανασταλτική δράση της SET στην ενεργότητα της PP2A, επηρεάζεται και από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της πρώτης. Συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση της Ser171 από την κινάση σερίνης/θρεονίνης PDK2 (Protein Kinase D2) σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, οδηγεί στη μείωση της ανασταλτικής ισχύος της SET έναντι της PP2A (Irie *et al.*, 2012).



### 1.3.5. Ο ρόλος της SET στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Ο κύκλος ζωής ενός κυττάρου περιγράφεται από μια σειρά διαδοχικών γεγονότων που καταλήγουν στη δημιουργία δύο νέων θυγατρικών κυττάρων. Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων διαιρείται στις φάσεις G1, S, G2 και Μίτωση ή Μείωση στην περίπτωση των γαμετικών κυττάρων, οι οποίες υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο. Το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου βασίζεται στην αλληπάλληλη ενεργοποίηση κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (Cyclin Dependent Kinases-CDKs) η ρύθμιση των οποίων επιτελείται μέσω της δημιουργίας συμπλόκων με τα αντίστοιχα μόρια κυκλινών (cyclins). Η SET εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω της αλληλεπίδρασής της με τα ρυθμιστικά σύμπλοκα CDK-κυκλινών ή/και τους αναστολείς τους.

Η πρώτη μελέτη που συνδέει τη SET με τον κυτταρικό κύκλο δημοσιεύθηκε το 1995 και αφορούσε την αναζήτηση νέων παραγόντων αλληλεπίδρασης με τις κυκλίνες. Μέσω πειραμάτων αλληλεπίδρασης με τις κυκλίνες A, B1 και B2 του *Xenopus* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες NAPI και SET. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι οι ομόλογες πρωτεΐνες NAPI και SET του *Xenopus* συνδέονται επιλεκτικά με τις κυκλίνες τύπου B και όχι τύπου A και πως αυτή η εξειδικευμένη δράση είναι εξελικτικά συντηρημένη (Kellogg *et al.*, 1995). Οι κυκλίνες B ενεργοποιούνται στη φάση της Μίτωσης και σχηματίζουν σύμπλοκο με τη κινάση CDK1.

Η SET συνδέεται στον αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21<sup>Cip1</sup> *in vivo* και *in vitro* και μπορεί μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης να αντιστρέψει την ανασταλτική του δράση έναντι του συμπλόκου κυκλίνης E/CDK2 όμως όχι του συμπλόκου κυκλίνης A/CDK2, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S (Estanyol *et al.*, 1999). Περαιτέρω μελέτες αναφορικά με την αλληλεπίδραση της SET με τον αναστολέα p21<sup>Cip1</sup> έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εμπλέκεται στη ρύθμιση της μετάβασης G2/M καθώς η υπερέκφραση της SET είχε ως συνέπεια τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την παραμονή των κυττάρων στη G2/M. Η συγκεκριμένη φάση ελέγχεται από την ενεργότητα της κυκλίνης B/CDK1, η οποία έχειδειχθεί ότι αναστέλλεται *in vitro* από τη SET όταν είναι συνδεδεμένη με τον p21<sup>Cip1</sup>. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η SET έχει διττό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου εφόσον επιδρά θετικά στη G1/S και αρνητικά στη φάση εισόδου στη Μίτωση (Canela *et al.*, 2003).

Ταυτόχρονα ο ρυθμιστικός ρόλος της SET στο σημείο ελέγχου G2/M έχει δειχθεί και μέσω του ρόλου της ως αναστολέα της PP2A. Κατά την G2/M η PP2A διατηρεί το σύμπλοκο κυκλίνης B/CDK1 (ή M-phase promoting factor- MPF) σε ανενεργή μορφή. Σε αυτή την περίπτωση η αναστολή της PP2A από τη SET συμβάλλει στην ενεργοποίηση του συμπλόκου και την προώθηση του κύκλου στη Μίτωση (Perrotti and Neviani, 2013).

Πέραν της Μίτωσης η SET συμμετέχει και στη Μείωση II καθώς είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων ωοκυττάρων ποντικού. Συγκεκριμένα κατά τη Μείωση I η υπομονάδα PP2A-B56 στρατολογείται στα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων από τη Shugoshin (Sgo) προκειμένου να διατηρηθεί ενεργή η πρωτεΐνη Rec8 και να παραμείνουν ενωμένες οι αδελφές χρωματίδες μέχρι τη Μετάφαση της Μείωσης II. Σε αυτή τη φάση ο προστατευτικός ρόλος της PP2A-B56 αναστέλλεται από τη SET και τα χρωμοσώματα διαχωρίζονται επιτυχώς (Chambon *et al.*, 2013). Η υπερέκφραση της SET σε ωοκύτταρα ποντικού είχε ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση και την πρόωρη ωρίμανση των γαμετικών κυττάρων (Qi *et al.*, 2013).

### 1.3.6. Ο ρόλος της SET στην απόπτωση

Ο κύκλος ζωής του κυττάρου ολοκληρώνεται φυσιολογικά με τη διαδικασία της απόπτωσης. Η απόπτωση είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου η οποία λειτουργεί ως μηχανισμός ομοιόστασης στη διατήρηση του κυτταρικού πληθυσμού. Επιπλέον μπορεί να επάγεται και ως μηχανισμός άμυνας κατά την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού στην προσβολή των κυττάρων από ιό ή τη μόλυνση από άλλους παράγοντες. Οι μηχανισμοί απόπτωσης χαρακτηρίζονται από αυξημένη πολυπλοκότητα και απαιτούν τη συμμετοχή πλήθους κυτταρικών μορίων. Τα βασικά μονοπάτια που ακολουθούνται διαχωρίζονται **στο εξώγενές** που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση υποδοχέων θανάτου (death receptors) στην κυτταρική επιφάνεια, το **ενδογενές** ή μιτοχονδριακό και το μονοπάτι **περφορίνης/ πρωτεασών** (Granzymes A,B) στο οποίο η ενεργοποίηση της απόπτωσης μπορεί να προκληθεί είτε από το GzmA ή από το GzmB. Στην περίπτωση του GzmA ενεργοποιείται ένας παράλληλος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου ανεξάρτητος κασπασών μέσω πρόκλησης θραύσεων μονής αλυσίδας στο DNA (Elmore, 2007).

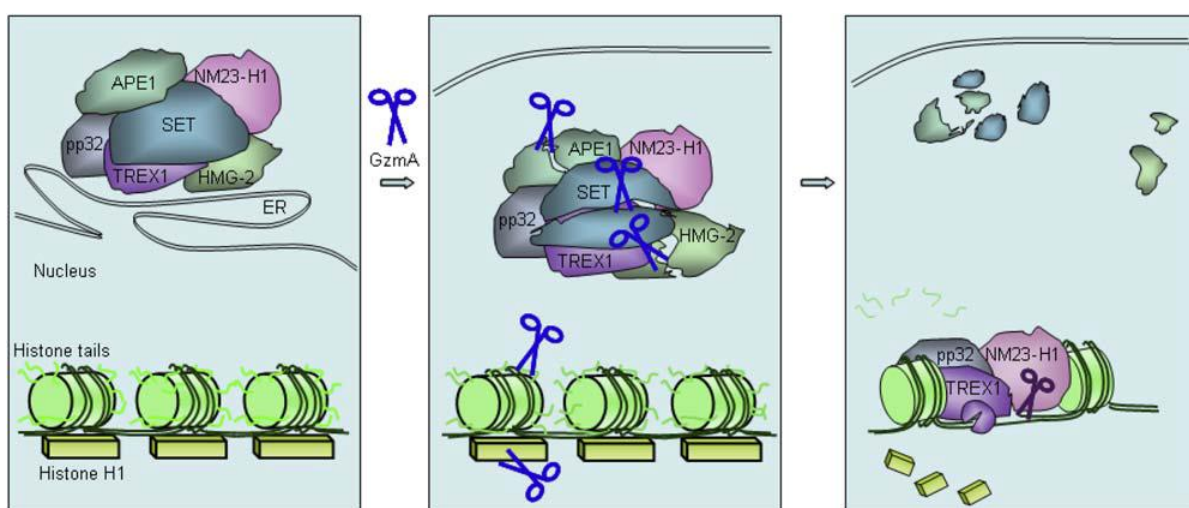
Η πρωτεΐνη SET έχει χαρακτηριστεί ως παράγοντας-κλειδί στη διαδικασία της απόπτωσης όταν αυτή επάγεται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs) έναντι καρκινικών κυττάρων ή κυττάρων που έχουν μολυνθεί από ιό. Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα επάγουν την απόπτωση απελευθερώνοντας κυτταρολυτικά κυστίδια που μεταφέρουν την περφορίνη, μια πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία πόρων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μαζί με τις πρωτεάσες σερινών Granzyme A και B (GzmA, B). Η πρωτεάση GzmA έχει ως στόχο ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων το οποίο είναι γνωστό ως σύμπλοκο SET (SET complex) (Beresford *et al.*, 2001).

### ***Σύμπλοκο SET***

Ο ρόλος της SET στην αναστολή των ακετυλοτρανσφερασών, όπως έχει ήδη περιγραφεί, εκφράζεται μέσω της συμμετοχής της πρωτεΐνης στο πυρηνικό σύμπλοκο INHAT το οποίο απαρτίζεται εκτός της SET, από την ομόλογή της TAF<sub>II</sub> και από την pp32 (Seo *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2001). Η αλληλεπίδραση της SET με την pp32 διαπιστώθηκε και κατά την απομόνωση των δύο πρωτεϊνών ως μέρος ενός μεγαλύτερου ετερογενούς κυτταροπλασματικού συμπλόκου μεγέθους ~200-440 kDa το οποίο εδράζεται στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο. Περαιτέρω χαρακτηρισμός οδήγησε στην ταυτοποίηση όλων των υπομονάδων του εν λόγω συμπλόκου που συνιστούν η ογκοπρωτεΐνη SET, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pp32, η νουκλεοσωμική πρωτεΐνη HMG2, η απουρινική ενδονουκλεάση του μονοπατιού επιδιόρθωσης μέσω εκτομής βάσεων Ape1 (Apurinic/Apyrimidinic endonuclease), η ογκοκατασταλτική κινάση διφωσφορικών νουκλεοτιδίων NM23-H1 και η 3'-5' εξωνουκλεάση TREX1 (Chowdhury *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2003a). Συνολικά πρόκειται για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης, την ακεραιότητά της και τον έλεγχο της μεταγραφής. Εξ αυτών, στόχο του GzmA αποτελούν οι SET, HMG2 και Ape1 (Beresford *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003b).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η πρωτεάση Granzyme A επάγει τον κυτταρικό θάνατο είναι άμεσα εξαρτώμενος της αλληλεπίδρασης του ενζύμου με το σύμπλοκο SET. Αρχικά, η αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου Granzyme A στο κύτταρο-στόχο, παρότι δεν επιδρά στην ακεραιότητα των μιτοχονδρίων, οδηγεί σε απώλεια δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και άμεση αύξηση δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) δημιουργώντας συνθήκες οξειδωτικού stress. Απόρροια αυτού

είναι η άμεση μετακίνηση του συμπλόκου SET στον πυρήνα (Martinvalet *et al.*, 2005). Έπειτα το GzmA, αλληλεπιδρά άμεσα με το σύμπλοκο και προκαλεί σχάση των πρωτεϊνών-στόχων καταστέλλοντας τη δράση τους στην κάμψη του DNA (HMG2), την επιδιόρθωση του DNA (Ape1) και την αναστολή της ενδονουκλεάσης NM23-H1 (SET). Η απελευθέρωση της NM23-H1 από την SET, επιτρέπει την πρόσδεσή της στο DNA και την πρόκληση μονόκλωνων θραύσεων. Η συνεργιστική δράση της TREX1 με την NM23-H1 αποτρέπει την επιδιόρθωση του DNA εξασφαλίζοντας τον κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 1.4) (Chowdhury *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2003a).



**Εικόνα 1.4. Προτεινόμενος μηχανισμός πρόκλησης βλαβών στο DNA μέσω GzmA.** Το σύμπλοκο SET υπό φυσιολογικές συνθήκες εντοπίζεται στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο. Η είσοδος του ενζύμου GzmA στο κύτταρο-στόχο οδηγεί το σύμπλοκο στο πυρήνα λόγω οξειδωτικού stress. Το GzmA προκαλεί τη σχάση των πρωτεϊνών SET, HMG2 και APE1 και την απελευθέρωση της ενδονουκλεάσης NM23-H1. Η NM23-H1 σε συνδυασμό με την TREX1, κατακερματίζει το DNA οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση (Chowdhury *et al.*, 2006).

Η δράση της SET στην απόπτωση ως απόκριση συνθηκών οξειδωτικού stress, επιβεβαιώνεται και μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων του συμπλόκου. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι παρουσία ενός οξειδωτικού παράγοντα, η SET συσσωρεύεται στα κύτταρα και ως αναστολέας της PP2A τα οδηγεί στην απόπτωση μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου κασπασών, πιθανά επηρεάζοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των Akt και PTEN (Leopoldino *et al.*, 2012). Παράλληλα σύμφωνα με άλλη μελέτη, ως απόκριση στο οξειδωτικό stress, η SET προωθεί την αποπτωτική διαδικασία μέσω παρεμπόδισης της

ακετυλίωσης του παράγοντα FoxO1 και ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου *p21* (Chae *et al.*, 2014).

Η SET εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο και μέσω ενός p53-εξαρτώμενου μονοπατιού. Σε συνθήκες κυτταρικού stress η p53 μετατοπίζεται στον πυρήνα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων της. Η SET ως υπομονάδα INHAT αναστέλλει την ακετυλίωση της πρωτεΐνης αυτής παρεμποδίζοντας έτσι την πρόσδεσή της στις περιοχές υποκινητών των γονιδίων-στόχων. Μέσω της αρνητικής ρύθμισης της δράσης της p53, η SET αναστέλλει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την αποπτωτική απόκριση (Kim J. Y. *et al.*, 2012).

Δεδομένα υποστηρίζουν ακόμη την εμπλοκή της SET στον μηχανισμό απόπτωσης που εξαρτάται από τη δράση των κασπασών. Συγκεκριμένα η έκθεση κυττάρων σε ακτίνες X επάγει την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού των κασπασών. Σε αυτή τη διαδικασία η SET υφίσταται πρωτεόλυση από την κασπάση 7 στο N-τελικό της άκρο με χρονο- και δοσο- εξαρτώμενο τρόπο (Morita *et al.*, 2000).

### **1.3.7. Ο ρόλος της SET στην επιδιόρθωση του DNA**

Βασική προτεραιότητα κάθε μορφής ζωής είναι η μετάδοση του γενετικού υλικού στην επόμενη γενιά διατηρώντας την ακεραιότητά του έναντι των δεκάδων χιλιάδων βλαβών που αυτό υφίσταται σε καθημερινή βάση. Οι παράγοντες που θέτουν σε κίνδυνο τη γενετική σταθερότητα διακρίνονται σε ενδογενείς, όπως η οξειδωση ή η αναντιστοιχία βάσεων (mismatch) και εξωγενείς, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και διάφοροι χημικοί παράγοντες. Κάθε μόνιμη βλάβη στο DNA μπορεί να πυροδοτήσει πλήθος παθολογικών καταστάσεων, ακόμη και το θάνατο. Προκειμένου να αντιμετωπίσουν αυτήν την απειλή, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς απόκρισης (DNA Damage Response, DDR) για την ανίχνευση βλαβών στο DNA και την άμεση επιδιόρθωσή τους (Jackson and Bartek, 2009). Οι κύριοι μηχανισμοί είναι η επιδιόρθωση με εκτομή βάσεων (Base Excision Repair, BER), η επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair, NER), η επιδιόρθωση λανθασμένων ζευγών βάσεων (Mismatch Repair) και η επιδιόρθωση θραύσεων διπλής έλικας (Double Strand Breaks, DSBs) μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination, HR) ή μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων (Non-Homologous End-Joining, NHEJ) (Hakem, 2008).

Στην προηγούμενη ενότητα περιγράφηκε ο ρόλος της SET στην πρόκληση βλαβών στο DNA ως αναστολέα της νουκλεάσης NM23-H1 μέσω του αντίστοιχου συμπλόκου. Παρότι η φυσιολογική λειτουργία του συμπλόκου SET δεν είναι γνωστή, βάσει της πρωτεϊνικής του σύστασης θεωρείται πιθανή η εμπλοκή του σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA λόγω οξειδωτικού stress (Fan *et al.*, 2003b; Lieberman and Fan, 2003).

Αντίστοιχα υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν την εμπλοκή της πρωτεΐνης SET στη διαδικασία επιδιόρθωσης τέτοιων βλαβών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η αλληλεπίδραση της SET με το σύμπλοκο πρωτεϊνών Ku. Το πρώτο βήμα κατά την επιδιόρθωση βλαβών με μη-ομόλογη σύνδεση άκρων είναι ο εντοπισμός και η πρόσδεση του ετεροδιμερούς Ku70/80 στα άκρα των DSBs, όπου στρατολογούν κι άλλους παράγοντες απαραίτητους για την αποκατάσταση των βλαβών. Η δράση των δύο πρωτεϊνών ρυθμίζεται από την προσθήκη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Συγκεκριμένα η Ku70 έχει δείχθει ότι ακετυλιώνεται σε κατάλοιπα λυσίνης από τις CBP και PCAF. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η SET συνδέεται με το ετεροδιμερές Ku70/80 *in vivo* και ως πρωτεΐνη INHAT αναστέλλει την ακετυλίωση της Ku70. Παρουσία βλάβης στο DNA αυτή η σύνδεση διακόπτεται και οι Ku70/80 μεταβαίνουν στο σημείο της δίκλωνης θραύσης. Ωστόσο σε περίπτωση υπερέκφρασης της SET, αφενός διαταράσσεται η ισορροπία σύνδεσης/αποσύνδεσης του συμπλόκου Ku με την SET, αναστέλλοντας την επιδιόρθωση του DNA μέσω NHEJ και αφετέρου παρεμποδίζεται η ακετυλίωση της Ku70 αποτρέποντας την αποπτωτική διαδικασία (Kim K. B. *et al.*, 2014).

Σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα αναφορικά με το ρυθμιστικό ρόλο της SET στη διαδικασία απόκρισης σε δίκλωνες θραύσεις του DNA έρχονται τα αποτελέσματα μιας ακόμη μελέτης. Η εν λόγω μελέτη αναδεικνύει το ρόλο της SET στην επιδιόρθωση DSBs μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού HR. Αντίστοιχα, πειράματα υπερέκφρασης της SET έδειξαν ότι αναστέλλει την επιδιόρθωση βλαβών μέσω HR καθώς δεσμεύεται στη χρωματίνη και επάγει τη συμπύκνωσή της, συγκρατώντας σε αυτή τις πρωτεΐνες KAP1 (Krüppel-associated box (KRAB)-Associated Protein 1) και HP1γ (Heterochromatin Protein 1γ) (Kalousi *et al.*, 2015).

### 1.3.8. Ο ρόλος της SET στην κυτταρική μετανάστευση

Η κυτταρική μετανάστευση συνιστά μια διαδικασία καθοριστικής σημασίας καθ' όλη τη ζωή ενός οργανισμού, από τη γέννηση έως και τον θάνατο. Η μαζική μετακίνηση κυττάρων είναι απαραίτητο γεγονός κατά τη μορφογένεση και τη δημιουργία των τριών βλαστικών στρωμάτων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η δυνατότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν επιτρέπει ακόμη την επούλωση πληγών στους ιστούς και την αναγέννηση. Επίσης, η κυτταρική μετανάστευση είναι βασική προϋπόθεση στην ανοσολογική απόκριση, όταν τα λευκά αιμοσφαίρια μεταναστεύουν από την κυκλοφορία του αίματος στους παρακείμενους ιστούς προκειμένου να καταστρέψουν μικροοργανισμούς που έχουν εισβάλει σε αυτούς ή κύτταρα που έχουν μολυνθεί. Πέραν των φυσιολογικών καταστάσεων, καταλυτική είναι η ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων και σε παθολογικές περιπτώσεις, χαρακτηριστικότερη των οποίων είναι ο καρκίνος. Αρχικό βήμα της διαδικασίας μετανάστευσης είναι η διαμόρφωση πολικότητας του κυττάρου και η προβολή μεμβρανικών προεκτάσεων προς την κατεύθυνση που πρόκειται να μετακινηθεί, μέσω αλλαγών στον κυτταροσκελετό. Ακολουθούν γεγονότα κυτταρικής προσκόλλησης-αποκόλλησης, αναδιαμόρφωσης της πλασματικής μεμβράνης και κυστιδιακής μεταφοράς που προωθούν την κυτταρική κίνηση (Ridley *et al.*, 2003).

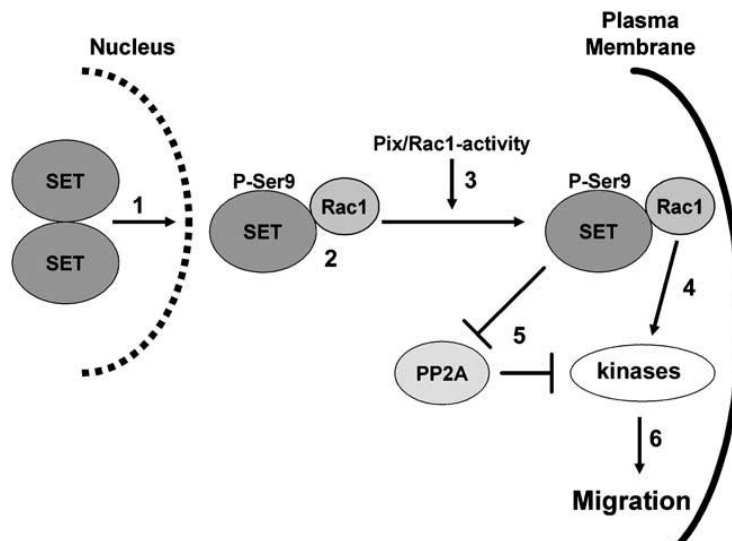
Σε υποκυτταρικό επίπεδο, η εκτέλεση των παραπάνω διαδικασιών υπαγορεύεται από τη συντονισμένη δράση μορίων που ανήκουν στις οικογένειες των Ras, Rab, Arf και Rho GTPασών. Οι Ras πρωτεΐνες μεσολαβούν την κυτταρική σηματοδότηση, οι Rab και Arf είναι υπεύθυνες για την κυστιδιακή μεταφορά και τη δυναμική των μικροσωληνίσκων ενώ οι Rho GTPάσες για τη δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Bishop and Hall, 2000). Οι πρωτεΐνες G λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες καθώς μεταπίπτουν από την ανενεργή μορφή (πρόσδεση GDP) στην ενεργή (πρόσδεση GTP) και αντίστροφα. Όταν βρίσκονται στην GTP-ενεργή κατάσταση υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές που διευκολύνουν τη σύνδεση και περαιτέρω ενεργοποίηση άλλων μορίων-τελεστών μέσω των οποίων επάγεται η κυτταρική σηματοδότηση. Σε αυτές τις διαδικασίες βασικό ρόλο παίζει και ο υποκυτταρικός εντοπισμός των G πρωτεϊνών που καθορίζεται από τη μεταβλητή καρβοξυτελική περιοχή. Οι ενεργές Rho GTPάσες ασκούν τη δράση τους όταν βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, στην περίπτωση της Rac1 όμως έχει δειχθεί ότι μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος πριν μεταβεί στη μεμβράνη και αυτό επιτυγχάνεται

μέσω αλληλεπίδρασης με την importin  $\alpha$  και την SET (Lam and Hordijk, 2013; Sandrock *et al.*, 2010; ten Klooster *et al.*, 2007).

Η συμμετοχή της SET στην κυτταρική μετανάστευση είναι απόρροια της αλληλεπίδρασής της με την Rac1. Αυτή η αλληλεπίδραση, έχειδειχθεί ότι ενισχύεται μετά από φωσφορυλίωση της SET στο κατάλοιπο Ser9, η οποία συνοδεύεται από τον μονομερισμό της πρωτεΐνης και την επακόλουθη μετακίνηση προς το κυτταρόπλασμα –αν και πιο πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν πως η σύνδεση των δύο πρωτεϊνών είναι ανεξάρτητη της κατάστασης φωσφορυλίωσης (Lam *et al.*, 2012). Η σύνδεση μεσολαβείται από την καρβοξυτελική περιοχή της Rac1 και την αντίστοιχη περιοχή NAP της SET. Το μονομερές της SET κατανέμεται στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με την PP2A και τη Rac1. Η Rac1 ενεργοποιείται από τον παράγοντα  $\beta$ -Pix και το σύμπλοκο καθοδηγείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όπου και δρα. Συνέπεια αυτής της μετακίνησης είναι η ενεργοποίηση κινασών και η επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών με σκοπό την προώθηση της κυτταρικής μετανάστευσης. Ο ρόλος της SET σε αυτή την περίπτωση είναι να ενισχύσει τη δράση της Rac1 μέσω ταυτόχρονης αναστολής της PP2A (Εικόνα 1.5) (ten Klooster *et al.*, 2007). Η PP2A μπορεί να παρέμβει στο μονοπάτι Rac1-PAK-p38MAPK καθώς έχειδειχθεί ότι αποφωσφορυλιώνει PAK κινάσες και αδρανοποιεί την p38MAPK (Sundaresan and Farndale, 2002; Zhan *et al.*, 2003).

Η αλληλεπίδραση της SET με τη Rac1 καθώς και ο ενισχυτικός της ρόλος στην Rac1-επαγόμενη σηματοδότηση ως προαπαιτούμενη για τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων αποδείχθηκε και μέσω πειραμάτων wound healing. Συγκεκριμένα με την υπερέκφραση του μεταλλάγματος YFP-SET $\Delta$ NLS το οποίο αλληλεπιδρά με τη Rac1, έδειξαν ότι η κυτταροπλασματική SET προωθεί την κυτταρική εξάπλωση και την κινητικότητα των κυττάρων, ενώ αντίθετα η αγρίου τύπου/πυρηνική SET δρα κατασταλτικά σε αυτές τις διαδικασίες (Lam *et al.*, 2013a).





**Εικόνα 1.5.** Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της SET στην ενίσχυση της κυτταρικής σηματοδότησης μέσω Rac1 στην προώθηση της κυτταρικής μετανάστευσης (ten Klooster *et al.*, 2007).

Τέλος, ο ρόλος της SET στη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης διαπιστώθηκε και κατά τη μελέτη της δράσης της στην περίπτωση πλακώδους κυτταρικού καρκινώματος του οισοφάγου (ESCC). Η SET επιδρά στην κατευθυνόμενη κυτταρική μετανάστευση και τη διαμόρφωση της εμπρόσθιας-οπίσθιας πολικότητας μέσω του συμπλόκου DOCK7/Rac1 και της πρωτεΐνης cofilin. Αναφορικά με τη DOCK7, ανήκει στην οικογένεια των GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factor) και δρα ως ενεργοποιητής της Rac1 ενώ η δράση της cofilin σχετίζεται τη δυναμική του κυτταροσκελετού καθώς ευθύνεται για τον αποπολυμερισμό των ινιδίων ακτίνης. Συνδυαστικά, η SET εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της Rac1 μέσω της DOCK7 ενώ παράλληλα συμβάλλει στην αύξηση του μεμβρανικού εντοπισμού τόσο της Rac1 όσο και της cofilin. Ο μηχανισμός δράσης της SET αφορά την καταστολή μέσω επιγενετικής ρύθμισης, του miR-30c το οποίο φυσιολογικά προσδένεται και παρεμποδίζει τη δράση των DOCK7 και cofilin (Yuan *et al.*, 2017).

#### 1.4. Υποκυτταρικός εντοπισμός της SET: ο ρόλος της φωσφορυλίωσης

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός μιας πρωτεΐνης συνδέεται άμεσα με την επιτέλεση της εκάστοτε λειτουργίας της. Μέσω αυτού εξασφαλίζεται η λειτουργική ποικιλομορφία των πρωτεϊνών και ταυτόχρονα γίνεται εξοικονόμηση στην σύνθεσή τους. Ακόμη, καθορίζει την πρόσβαση των πρωτεϊνών στα αλληλεπιδρώντα μόρια και την μηχανή μετα-

μεταφραστικών τροποποιήσεων και καθιστά δυνατή την ενσωμάτωσή τους σε λειτουργικά βιολογικά δίκτυα (Hung and Link, 2011).

### ***Πυρηνική-κυτταροπλασματική μετακίνηση (shuttling)***

Ο πυρήνας και συγκεκριμένα το πυρηνόπλασμα διαχωρίζεται από το κυτταρόπλασμα μέσω του πυρηνικού φακέλου, μιας πολύπλοκης δομής αποτελούμενης από δύο στοιχειώδεις μεμβράνες, την πυρηνική λάμινα που τον επενδύει εσωτερικά και την εξωτερική μεμβράνη που αποτελεί συνέχεια του Ενδοπλασματικού Δικτύου. Ο πυρηνικός φάκελος διακόπτεται από τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων (Nuclear Pore Complexes, NPC). Πρόκειται για σύνθετες δομές, αποτελούμενες από νουκλεοπορίνες, που ευθύνονται για την επιλεκτική μεταφορά μικρών πολικών μορίων και μακρομορίων ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Ο κύκλος πυρηνικής εισόδου/εξόδου μορίων συντελείται από τη δράση των καρυοφερινών (importins, exportins). Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα μονοπάτια πυρηνικής εισόδου και εξόδου αφορούν τις importins  $\alpha/\beta$  και την exportin 1/CRM1, αντίστοιχα. Η δράση των καρυοφερινών στην αναγνώριση και μεταφορά πρωτεϊνών-φορτίων υπαγορεύεται από την ύπαρξη συγκεκριμένων αμινοξικών μοτίβων τα οποία διακρίνονται στα Σήματα Πυρηνικού Εντοπισμού (NLS) και Πυρηνικής Εξόδου (NES) (Bauer *et al.*, 2015).

Εντός του κυττάρου η SET χαρακτηρίζεται κυρίως από πυρηνικό εντοπισμό, όπως δικαιολογούν και οι δράσεις της σχετικά με τις ιστόνες, τη χρωματίνη, τη γονιδιακή έκφραση και τον κυτταρικό κύκλο. Ωστόσο πλήθος μελετών που έχουν σχέση με την απόπτωση, την κυτταρική μετανάστευση και τις λειτουργίες της στο νευρικό σύστημα, περιγράφουν τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα (Lam *et al.*, 2012). Επομένως η δυναμική μετακίνηση της SET μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος συσχετίζεται με τις δράσεις που καλείται να επιτελέσει στο κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα όπως και των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά.

Το σύνολο των πρωτεϊνών που παλινδρομούν μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (nucleo-cytoplasmic shuttling) όπου εντάσσεται και η SET, περιλαμβάνει υποδοχείς στεροειδών ορμονών, μεταγραφικούς παράγοντες, παράγοντες ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και πλήθος πρωτεϊνών που συνδέονται στο RNA. Κοινό χαρακτηριστικό όλων είναι η ύπαρξη στην αλληλουχία τους Σημάτων Πυρηνικού Εντοπισμού (NLS) και Πυρηνικής Εξόδου (NES) (Gama-Carvalho and Carmo-Fonseca, 2001).

Η στόχευση της SET στον πυρήνα αποδίδεται στην ύπαρξη ενός Σήματος Πυρηνικού Εντοπισμού το οποίο βρίσκεται προς το τέλος της NAP περιοχής και αποτελείται από δύο στοιχεία αλληλουχίας βασικών αμινοξέων KR (<sup>168</sup>**KRSSQTQNKASRKR**<sup>181</sup>) (Beresford *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2007). Η διαδικασία εισόδου της πρωτεΐνης στον πυρήνα ενεργοποιείται με την αναγνώριση του ασυνεχούς NLS από την importin α και την πρόσδεσή της σε αυτό, σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές. Ακολουθεί η σύνδεση της importin β η οποία αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του πυρηνικού πόρου και οδηγεί το σύμπλοκο impα/impβ/SET εντός του πυρήνα (Qu *et al.*, 2007). Σύμφωνα με πιο πρόσφατη έρευνα η SET (TAF1β) φέρει και ένα δεύτερο NLS στην αμινοτελική περιοχή όπου οι δύο ισομορφές διαφέρουν (<sup>6</sup>**AKVSKK**<sup>11</sup>) (Yu G. *et al.*, 2013).

Όσον αφορά την έξοδο των μορίων προς το κυτταρόπλασμα, απαραίτητη είναι η δράση της καρνοφερίνης CRM1 η οποία έχει ταυτοποιηθεί ως ο υποδοχέας πυρηνικής εξαγωγής πρωτεϊνών που φέρουν σήματα NES πλούσια σε κατάλοιπα Leu. Μέχρι στιγμής δεν έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη σήματος NES στην αλληλουχία της SET, παρότι στη δομικά ομόλογη πρωτεΐνη της SET, NAP1, έχει εντοπιστεί στο άκρο της αντίστοιχης περιοχής διμερισμού (Park Y. J. and Luger, 2006b). Εντούτοις είναι πιθανό ο μηχανισμός εξόδου της SET από τον πυρήνα να βασίζεται σε αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με άλλα μόρια που φέρουν σήματα NES. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η pp32 με την οποία η SET απαντάται ως σύμπλοκο τόσο στον πυρήνα (INHAT) όσο και στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (σύμπλοκο SET). Η pp32 είναι μία φωσφοπρωτεΐνη η οποία φέρει τρεις περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα Leu και έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τη CRM1 (Beresford *et al.* (2001); Gallouzi *et al.*, 2001).

Ένας ακόμη μηχανισμός εξόδου της SET από τον πυρήνα θα μπορούσε να προκύπτει από την αλληλεπίδρασή της με την καταλυτική υπομονάδα της PP2A (PP2A-C). Είναι γνωστό ότι η ρυθμιστική υπομονάδα B56α της PP2A μετακινείται από και προς τον πυρήνα και πως η έξοδός της στο κυτταρόπλασμα υπαγορεύεται από την ύπαρξη σήματος NES και την επακόλουθη πρόσδεση σε αυτό της CRM1. Μέσω της πρόσδεσης της B56α στην καταλυτική υπομονάδα, η πρώτη δρα ως μόριο-συνοδός της δεύτερης και διευκολύνει την μετακίνησή της εκτός του πυρήνα (Flegg *et al.*, 2010). Επομένως η SET θα μπορούσε να εξέλθει του πυρήνα είτε μέσω σχηματισμού του συμπλόκου PP2AB56α/PP2AC/SET ή μέσω της ισομορφής B56β η οποία διαθέτει σήμα εξόδου NES,

είναι υπεύθυνη για τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της PP2A και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την SET (Vera *et al.*, 2007). Τέλος, η ογκοπρωτεΐνη SET/Nup214, προϊόν έκφρασης του γονιδίου σύντηξης *SET/CAN*, έχει δειχθεί ότι σχηματίζει σύμπλοκο με την CRM1 μέσω της νουκλεοπορίνης Nup214 και την συγκρατεί σε συγκεκριμένες περιοχές στον πυρήνα παρεμβαίνοντας στην έξοδο πρωτεϊνών με σήματα NES (Saito *et al.*, 2016).

### **Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης**

Είναι γνωστό ότι η μεταβλητή φωσφορυλίωση (variable phosphorylation) αμινοξικών καταλοίπων πυρηνικών πρωτεϊνών έχει αντίκτυπο στη λειτουργία τους όσον αφορά τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, την αντιγραφή, τη διαμόρφωση της χρωματίνης και την πυρηνική μετακίνηση, παράλληλα συνιστά ένα μηχανισμό μέσω του οποίου εξωτερικά ερεθίσματα καθοδηγούν γεγονότα εντός του πυρήνα (Nishi *et al.*, 2011; Papavassiliou *et al.*, 1992).

Στα πλαίσια του αρχικού χαρακτηρισμού της SET διερευνήθηκε βάσει της αλληλουχίας της κατά πόσον αποτελεί υπόστρωμα τροποποιητικών ενζύμων. Βρέθηκε ότι συνιστά πρωτεΐνη-στόχο κινασών και πως φωσφορυλιώνεται *in vivo* στα κατάλοιπα Ser9 και Ser24 (Adachi *et al.*, 1994). Εκ των προαναφερθεισών τροποποιήσεων, εκτενέστερα μελετημένη είναι η φωσφορυλίωση της Ser9, λόγω της επίπτωσης που έχει στον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης και κατ' επέκταση στις δράσεις της. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της Ser9, επάγει δομικές αλλαγές στο μόριο καθώς καταργεί το διμερισμό ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην αλληλεπίδραση της SET με τη Rac1 (ten Klooster *et al.*, 2007). Επιπλέον, η συγκεκριμένη τροποποίηση στη Ser9 παρεμβαίνει στην αναγνώριση του αμινοτελικού NLS (<sup>6</sup>AKVSKK<sup>11</sup>) από την importin α και παρεμποδίζει τον σχηματισμό ετεροδιμερούς. Με αυτόν τον τρόπο δεν δημιουργείται το σύμπλοκο SET/importin α και η SET παραμένει στο κυτταρόπλασμα όπου και συσσωρεύεται (Yu G. *et al.*, 2013).

Ανεξάρτητα των μηχανισμών που χρησιμοποιεί η SET για την μετακίνησή της από τον πυρήνα, όπου κατ' εξοχήν βρίσκεται, στο κυτταρόπλασμα και αντίστροφα, έχει δειχθεί σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας ότι αυτή η μετακίνηση γίνεται αυθόρμητα και έχει παροδικό χαρακτήρα (Lam *et al.*, 2012).

## 1.5. Η SET στο νευρικό σύστημα

Η κατανομή της SET είναι ευρεία μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων και ιστών. Συγκεκριμένα εκφράζεται στον μυελό των οστών, τον σπλήνα, τον εγκέφαλο, το ήπαρ, τους νεφρούς, τους όρχεις, τις ωθήκες, τους πνεύμονες και την καρδιά (Dai *et al.*, 2014; Kim E. G. *et al.*, 1994; Nagata *et al.*, 1998; von Lindern *et al.*, 1992). Κατά τη σύγκριση των προτύπων έκφρασης των δύο ισομορφών σε ιστούς ποντικού με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων διαπιστώθηκε ότι η TAFIα παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στους νεφρούς και τον σπλήνα ενώ η TAFIβ είναι η κύρια εκφραζόμενη πρωτεΐνη στα κύτταρα του εγκεφάλου (Nagata K. *et al.*, 1998). Έκτοτε πλήθος μελετών έχουν ασχοληθεί με τη διερεύνηση του ρόλου της SET στον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα.

Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος συνιστά μια πολύ καλά συντονισμένη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, τη νευρωνική μετανάστευση, την προβολή και καθοδήγηση των νευραξόνων, τη δημιουργία συνάψεων και τη δεσμιδοποίηση των νευρικών ινών. Καθένα από τα παραπάνω συντονίζεται από ένα σύνολο αυστηρά ελεγχόμενων γεγονότων που καθορίζουν οι μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση. Σημαντική πτυχή της μεταγραφικής ρύθμισης είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των N-τελικών άκρων των ιστονών.

### *Μεταγραφική ρύθμιση*

Ειδικότερα όσον αφορά την ακετυλίωση καθοριστικός είναι ο ρόλος του συμπλόκου INHAT και των υπομονάδων του. Στο πλαίσιο αυτό εξετάστηκε η σύνδεση της SET με την πρόωμη ανάπτυξη του νευρικού συστήματος σε προνύμφες *Drosophila* διαφόρων σταδίων. Αυξημένη έκφραση της SET εντοπίστηκε στους νευρώνες του ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα) και στο αρχέγονο αισθητήριο σύστημα, υποδεικνύοντας λειτουργική σχέση της πρωτεΐνης με το αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα κατά την εμβρυογένεση. Πειράματα καταστολής της SET σε κύτταρα νευροβλαστώματος οδήγησαν στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-δεικτών της νευρικής διαφοροποίησης όπως *synapsin 1*, *neurofilament medium chain (NF-M)* και *microtubule-associated protein 1α (MAP1α)*, αποκαλύπτοντας έναν αρνητικό ρόλο της πρωτεΐνης στη ρύθμιση των γονιδίων αυτών. Περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου η SET δρα, έδειξε ότι πριν την έναρξη της διαφοροποίησης προσδένεται ειδικά στους υποκινητές των γονιδίων *synapsin 1* και *MAP1α* και παρεμποδίζει την έκφρασή τους. Ο μηχανισμός αυτός αντιστρέφεται μετά

την επαγωγή της διαφοροποίησης όπου διαπιστώνεται μείωση της πρόσδεσης της SET στις περιοχές των υποκινητών και ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων ακετυλίωσης της ιστόνης H4. Επομένως, η SET αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της νευρωνικής διαφοροποίησης καθώς αναστέλλει την ακετυλίωση γονιδίων-στόχων και την μεταγραφική τους ενεργοποίηση (Kim D. W. *et al.*, 2010). Αντίστοιχη είναι και η δράση της πρωτεΐνης pp32 (LANP) ως έτερης υπομονάδας INHAT, στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των νευρώνων. Η pp32 προσδέεται στον υποκινητή του γονιδίου *neurofilament light chain (Nf-L)* και αναστέλλει την ακετυλίωση των παρακείμενων ιστονών (Kular *et al.*, 2009).

### **Κυτταρικός κύκλος**

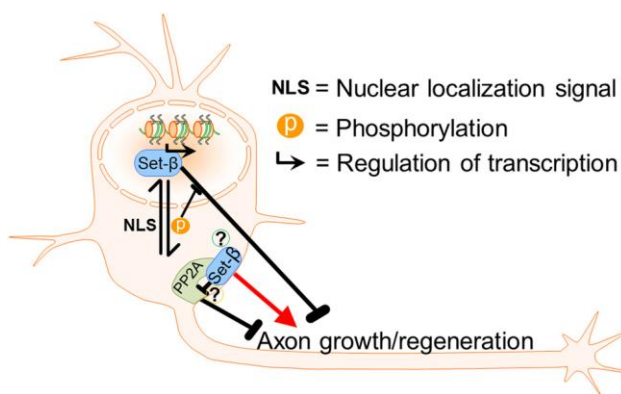
Ο ρόλος της SET στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου όπως έχει ήδη περιγραφεί αφορά στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με κυκλίνες και τον αναστολέα p21<sup>Cip1</sup>. Στο νευρικό σύστημα η SET σχετίζεται με τη δράση της Cdk5 η οποία διαφέρει από τις υπόλοιπες κινάσες λόγω της ενεργότητάς της στους μετα-μιτωτικούς νευρώνες του ΚΝΣ. Στα εν λόγω κύτταρα η Cdk5 αλληλεπιδρά με δύο πρωτεΐνες ενεργοποιητές, την p35<sup>nk5a</sup> και την ισομορφή της p39<sup>nk5ai</sup>, οι οποίες εκφράζονται και δρουν ως κυκλίνες αποκλειστικά στο ΚΝΣ. Το σύμπλοκο που σχηματίζει η κινάση Cdk5 με τους ενεργοποιητές εμπλέκεται στη νευρωνική διαφοροποίηση, τη δυναμική του κυτταροσκελετού, τον εκφυλισμό των νευρώνων και τον κυτταρικό θάνατο. Η SET συνδέεται μέσω της όξινης C-τελικής περιοχής της με την πρωτεΐνη p35<sup>nk5a</sup> και προωθεί την ενεργότητα του συμπλόκου p35<sup>nk5a</sup>/Cdk5. Επομένως, είναι πιθανό η SET να επιδρά στην ενεργοποίηση/ απενεργοποίηση υποστρωμάτων μέσω φωσφορυλίωσης/ αποφωσφορυλίωσης ενισχύοντας τη δράση της Cdk5 και ταυτόχρονα αναστέλλοντας την PP2A (Qu *et al.*, 2002).

### **Ανάπτυξη νευρικών δομών**

Το ευρύ φάσμα των δράσεων της SET σχετικά με την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος επεκτείνεται σε επίπεδο σχηματισμού δομών όπως προκύπτει από την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη προσκόλλησης NFPC (NF-Protocadherin) του *Xenopus*. Η δράση της NFPC είναι απαραίτητη κατά τη νευριδίωση του *Xenopus* καθώς επιλαμβάνεται των διακυτταρικών επαφών ώστε το εξώδερμα να εγκλωπωθεί για να σχηματίσει τον νευρικό σωλήνα. Οι δύο πρωτεΐνες, SET και NFPC, έχουν όμοια πρότυπα έκφρασης στις νευρικές ακρολοφίες κατά τα εμβρυικά στάδια ανάπτυξης του *Xenopus* και

η κοινή τους δράση σε αυτές τις θέσεις είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του νευρικού σωλήνα (Rashid *et al.*, 2006). Επιπλέον του νευρικού σωλήνα, αυξημένη έκφραση της NFPC έχει εντοπιστεί στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus* και συγκεκριμένα στους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων (Retinal Ganglion Cells, RGCs) όπου αντίστοιχα υψηλά είναι και τα επίπεδα της SET. Η συνδυαστική δράση των δύο πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της αξονογένεσης και της επιμήκυνσης των νευραξόνων, με την SET να αποτελεί κυτταροπλασματικό συμπάραγοντα της NFPC (Heggem and Bradley, 2003; Piper *et al.*, 2008).

Εκτός των μοριακών αλληλεπιδράσεων μιας πρωτεΐνης ένας ακόμη παράγοντας που δύναται να επηρεάσει τη λειτουργική της συμπεριφορά είναι ο υποκυτταρικός της εντοπισμός. Εκτός από το *Xenopus*, η SET έχειδειχθεί ότι εκφράζεται στα RGCs του αμφιβληστροειδή του ποντικού κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης. Ο ρόλος της και σε αυτή την περίπτωση σχετίζεται με την ρύθμιση της αύξησης των νευραξόνων και της αναγεννητικής τους ικανότητας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ωστόσο η επίδραση της υποκυτταρικής της κατανομής στο συντονισμό αυτών των διαδικασιών εφόσον όταν η SET βρίσκεται στον πυρήνα καταστέλλει την αύξηση των νευριτών, ενώ όταν μετακινείται λόγω φωσφορυλίωσης (της Ser9) στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αφενός προωθεί την αύξηση των αξόνων των RGCs και αφετέρου επάγει την αναγέννηση του άξονα του οπτικού νεύρου ενήλικων ποντικών μετά από τραυματισμό. Συνολικά μπορεί να υποθεθεί ότι η δράση της SET στον πυρήνα αποδίδεται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ενώ στο κυτταρόπλασμα και τις μεμβράνες μέσω συμπαραγόντων όπως η PP2A (Εικόνα 1.6) (Trakhtenberg *et al.*, 2014).



**Εικόνα 1.6. Προτεινόμενος μηχανισμός ρύθμισης της Setβ σε σχέση με την αύξηση και την αναγέννηση των νευραξόνων.** Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της Setβ καθορίζεται από το σήμα NLS και από την φωσφορυλίωσή της. Στον πυρήνα, η πρωτεΐνη ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων και καταστέλλει την αύξηση των αξόνων ενώ αφότου μεταβεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη προωθεί την αύξηση και την αναγέννησή τους (Trakhtenberg *et al.*, 2014).

### Απόπτωση

Η ενδοκυτταρική κατανομή της SET είναι σημαντική και στην απόπτωση. Όσον αφορά το νευρικό σύστημα έχει βρεθεί ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες η υποκυτταρική θέση της SET στα κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού, του μεσεγκεφάλου και του προμήκη μυελού είναι αποκλειστικά πυρηνική. Αντίθετα, μετακίνηση της πρωτεΐνης παρατηρείται όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε παράγοντες με γενotoξική δράση. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου καθοδηγείται η μετατόπιση της SET στο κυτταρόπλασμα δεν είναι σαφής, ωστόσο εμπλέκει την πρωτεολυτική διάσπασή της σε ένα μικρότερου μεγέθους προϊόν το οποίο διατηρείται εκτός πυρήνα και επάγει την απόπτωση των νευρικών κυττάρων λόγω προκαλούμενων βλαβών στο DNA (Qu *et al.*, 2007).

Ωστόσο αυτή δεν είναι η μοναδική μελέτη που συνδέει τηνσχάση της SET με την απόπτωση. Όπως έχει ήδη περιγραφεί κατά την ανοσολογική απόκριση η SET πρωτεολύεται από το ένζυμο GzmA μέσω διάσπασης πεπτιδικού δεσμού στη Lys176 και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση. Πέραν του ανοσοποιητικού, αντίστοιχος μηχανισμός ακολουθείται και στο νευρικό σύστημα. Σε αυτή την περίπτωση καθοριστικός είναι ο ρόλος της ενδοπεπτιδάσης Ape (Asparagine Endopeptidase). Η δράση της Ape μελετήθηκε σε συνθήκες ενδοκυτταρικής οξέωσης λόγω εγκεφαλικού επεισοδίου σε ποντικό. Η μείωση των επιπέδων pH ωθεί τα κύτταρα σε απόπτωση μέσω ενός μηχανισμού κατά τον οποίο ενεργοποιείται η Ape και πρωτεολύει τη SET μετά το κατάλοιπο Asn175, επιτρέποντας έτσι την απελευθέρωση από το σύμπλοκο SET των νουκλεασών NM23-H1 και TREX1 και τη μετάβασή τους στον πυρήνα με σκοπό την καταστροφή του DNA (Liu Z. *et al.*, 2008). Κοινό χαρακτηριστικό των GzmA και Ape είναι ότι στοχεύουν τη SET σε αμινοξικές θέσεις εντός του ασυνεχούς NLS (<sup>168</sup>**KRSSQTQN↓K↓ASRKR**<sup>181</sup>) με αποτέλεσμα να το διακόπτουν επηρεάζοντας την κατανομή των μικρότερων τμημάτων της SET (αα 1-175 ή αα 1-176) εντός του κυττάρου.

Όμοια είναι τα αποτελέσματα από την μελέτη του προτύπου έκφρασης της SET στα RGCs. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων βρέθηκε πως η SET είναι κυρίως πυρηνική και πως υπάρχει μια μικρότερου μεγέθους ισομορφή ~25 kDa η οποία είναι κυρίως κυτταροπλασματική και δεν διαθέτει NLS. Περαιτέρω μελέτη του ρόλου αυτής της ισομορφής με πειράματα υπερέκφρασης της SETΔC (αα 1-176) σε RGCs, έδειξε ότι εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα και πως επάγει τον κυτταρικό θάνατο καθώς εντός 3 ημερών το σύνολο των κυττάρων με χαρακτηριστικούς πυκνωτικούς



πυρήνες και διογκωμένο κυτταρόπλασμα, οδηγήθηκαν σε απόπτωση (Trakhtenberg *et al.*, 2015).

Τέλος, σύμφωνα με πειράματα που έγιναν σε νευρικά κύτταρα φλοιού τα οποία είχαν απομονωθεί από έμβρυα αρουραίου, η SET αλληλεπιδρά με το κυτταροπλασματικό τμήμα Jcasp της πρόδρομης πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς APP (Amyloid precursor protein). Η αυξημένη σύνθεση β-αμυλοειδούς και η εξωκυττάρια εναπόθεσή του στους νευρώνες θεωρείται σήμερα ως η πιθανότερη αιτία παθογένεσης της νόσου Alzheimer. Η μειωμένη έκφραση της SET στους πρώιμους νευρώνες οδηγεί σε μείωση των επιπέδων απόπτωσης που επάγει το Jcasp ενώ υπερέκφραση της πρωτεΐνης οδηγεί τα νευρικά κύτταρα σε απόπτωση ανεξάρτητα του Jcasp (Madeira *et al.*, 2005).

Με βάση τα παραπάνω επιβεβαιώνεται ο ρόλος της SET στη ρύθμιση της απόπτωσης των νευρικών κυττάρων, ενώ αναδεικνύεται ο πιθανός ρόλος της πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης σε αυτή τη διαδικασία.

### ***Νόσος Alzheimer: Ο ρόλος της SET***

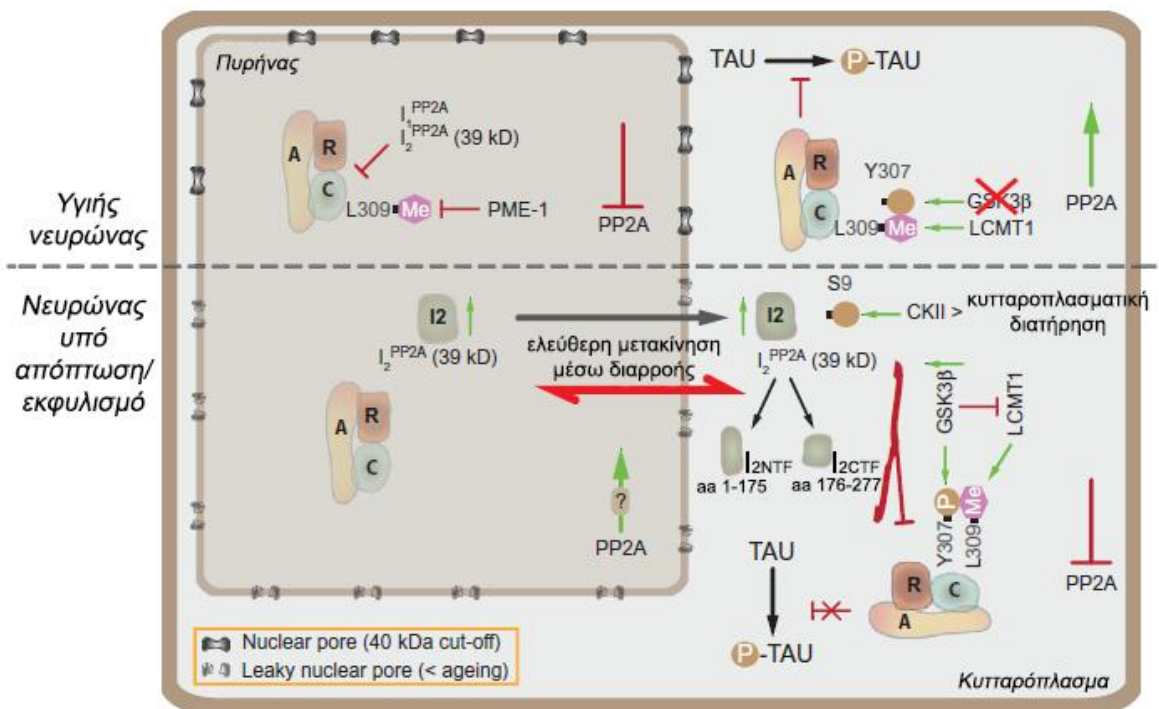
Η νόσος Alzheimer (AD) είναι μία νευροεκφυλιστική ασθένεια η οποία επηρεάζει κυρίως ηλικιωμένα άτομα και έχει επιπτώσεις στη γνωστική λειτουργία, τη μνήμη και την ομιλία. Το 1907, ο Alois Alzheimer Γερμανός ψυχίατρος, περιέγραψε για πρώτη φορά τα χαρακτηριστικά αυτής της νόσου όπως τα κατέγραψε μελετώντας μία 51- ετών ασθενή του η οποία έπασχε από πρόωρη άνοια. Τα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνουν εκτεταμένη κατανομή νευρωνικών πλεγμάτων και αμυλοειδών πλακών στον εγκέφαλο που μαζί με τη νευρωνική δυστροφία, τη νευρωνική απώλεια και τις αγγειακές αλλοιώσεις αποτελούν τα βασικά γνωρίσματα της νόσου (Bali *et al.*, 2010; De Strooper and Karran, 2016).

Οι περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται κατά την εκδήλωση αυτής της νόσου και σχετίζονται με την νοητική ικανότητα των ατόμων χαρακτηρίζονται από ενδοκυττάριας κυτταροσκελετικές αλλοιώσεις γνωστές ως νευροϊνιδιακοί κόμβοι (neurofibrillary tangles, NFTs). Βασικό συστατικό των NFTs είναι η πρωτεΐνη Tau, η οποία ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών που συνδέονται με μικροσωληνίσκους (Microtubule Associated Proteins, MAPs). Στα υγιή νευρικά κύτταρα οι πρωτεΐνες αυτές συνδεόμενες με την εξωτερική επιφάνεια των μικροσωληνίσκων, τους προσδίδουν σταθερότητα και ακαμψία. Ωστόσο στις νευροεκφυλιστικές παθήσεις, όπως η νόσος Alzheimer, η Tau υπερφωσφορυλιώνεται και συσσωρεύεται στα ινίδια σχηματίζοντας

συσσωματώματα (Iqbal *et al.*, 2010). Αποτέλεσμα αυτού είναι η αποδιοργάνωση και η αποδόμηση των μικροσωληνίσκων που οδηγεί τελικά το κύτταρο σε απόπτωση.

Η φωσφορυλίωση της Tau ρυθμίζεται από την ισορροπημένη αλληλεπίδραση κινασών και φωσφατασών. Η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης, βασική αιτία εκδήλωσης AD, αποδίδεται σε μειωμένη ενεργότητα των φωσφατασών PP1 και PP2A. Σχετικά με τη PP2A, η ενεργότητά της ρυθμίζεται τόσο από την προσθήκη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων όσο και από τη δράση ενδογενών αναστολέων όπως η I1PP2A (pp32, PHAPI) και η I2PP2A (SET, TAFIβ) (Ενότητα 1.3.4). Σημαντικά ήταν τα ευρήματα που προέκυψαν από πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε ανθρώπινους εγκεφάλους ασθενών AD. Συγκεκριμένα, αποκάλυψαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των δύο αναστολέων στον κροταφικό και ενδορινικό φλοιό, μετατοπισμένη ενδοκυτταρική εντόπιση της I2PP2A από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα συνοδευόμενη από αυξημένη πρωτεόλυση της πρωτεΐνης καθώς και συνεντοπισμό των δύο αναστολέων με την PP2A στο κυτταρόπλασμα και με την Tau σε νευρώνες με κυτταροσκελετικές αλλοιώσεις (Tanimukai *et al.*, 2005).

Περαιτέρω μελέτες εστίασαν στη διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων η SET ρυθμίζει τη δράση της PP2A και επιδρά στην υπερφωσφορυλίωση της Tau, εστιάζοντας στην πρωτεόλυση και τον κυτταροπλασματικό της εντοπισμό. Στα παθολογικά κύτταρα εγκεφάλων ασθενών Alzheimer, η SET υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση στην Asn175 από την οποία προκύπτουν ένα αμινοτελικό πολυπεπτίδιο (I2NTF, αα 1-175) και ένα καρβοξυτελικό (I2CTF, αα 176-277), τα οποία διαχέονται στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρούν με την PP2A, αναστέλλοντάς την ισχυρά (Arnaud *et al.*, 2011). Η μετακίνηση της SET εκτός πυρήνα μεσολαβείται από την κινάση CKII (Casein Kinase II) η οποία τη φωσφορυλιώνει στη Ser9. Η συγκεκριμένη τροποποίηση επηρεάζει την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα καθώς διαταράσσει το NLS (<sup>6</sup>AKVSKK<sup>11</sup>), προκαλώντας έτσι τη συσσώρευσή της στο κυτταρόπλασμα (Yu G. *et al.*, 2013). Ομοίως συμβαίνει και μετά από αδρανοποίηση του ασυνεχούς NLS (αα 168-169 και 179-181). Η υπερέκφραση του μεταλλάγματος mNLS-I2PP2A συνεπάγεται κυτταροπλασματική διατήρηση της πρωτεΐνης και ενεργοποίηση της κινάσης GSK3β η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την PP2A προκαλώντας τελικά υπερφωσφορυλίωση της Tau (Arif *et al.*, 2014). Οι μηχανισμοί ρύθμισης της PP2A όπως περιγράφηκαν παραπάνω, συνοψίζονται στην Εικόνα 1.7.



**Εικόνα 1.7. Η ρύθμιση της PP2A στα νευρικά κύτταρα.** Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η PP2A παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau παραμένοντας ανενεργή στον πυρήνα και ενεργή στο κυταρόπλασμα των νευρώνων. Σε συνθήκες απόπτωσης, νευρικού εκφυλισμού ή ως συνέπεια της κυτταρικής γήρανσης οι πυρηνικοί πόροι χάνουν την ακεραιότητά τους επιτρέποντας τη διαρροή των μορίων. Η SET/I2PP2A μετατοπίζεται στο κυταρόπλασμα όπου υφίσταται σχάση, προϊόντα της οποίας είναι ένα αμινοτελικό πολυπεπτίδιο I2NTF (aa 1-175) και ένα καρβοξυτελικό I2CTF (aa 176-277). Η φωσφορυλίωση της I2PP2A στη Ser9 από την CKII οδηγεί στη διατήρηση της πρωτεΐνης στο κυταρόπλασμα, η οποία σε συνδυασμό με την αυξημένη ενεργότητα της GSK3β, αναστέλλει τη δράση της PP2A και επάγει την υπερφωσφορυλίωση της Tau (Liu C. and Gotz, 2013).

## 1.6. Η SET στον καρκίνο

Η ταυτοποίηση της SET ως προϊόν έκφρασης του γονιδίου σύντηξης *SET/CAN* σε ασθενή που έπασχε από Μυελογενή Λευχαιμία, αποτέλεσε την πρώτη αναφορά που συνδέει την έκφραση της πρωτεΐνης με τον καρκίνο. Έκτοτε έχει δημοσιευθεί σημαντικός αριθμός εργασιών που αναδεικνύουν το ρόλο της SET στην ογκογένεση και την κατοχυρώνουν ως ογκοπρωτεΐνη. Αυξημένα επίπεδα της SET έχουν ανιχνευθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως το νεφροβλάστωμα (όγκος του Wilms) (Carlson *et al.*, 1998), ο καρκίνος των ωοθηκών (Ouellet *et al.*, 2006), του παχέος εντέρου, του στόματος και του λαιμού (Dong *et al.*, 2014) και των πνευμόνων (Liu H. *et al.*, 2015) καθώς και αιματολογικών κακοηθειών, όπως η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, το μη-Hodgkin λέμφωμα (Christensen *et al.*, 2011).

Τα βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι ότι ανθίστανται στην απόπτωση, σε σήματα που σταματούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA και σε μηχανισμούς άμυνας. Ακόμη κάνουν μεταστάσεις, πολλαπλασιάζονται παρουσία ή μη αυξητικών παραγόντων και επάγουν αγγειογένεση εξασφαλίζοντας την αιμάτωσή τους (Hanahan and Weinberg, 2011).

Η συμβολή της SET στην καρκινογένεση καθορίζεται από το πρότυπο έκφρασης και τον λειτουργικό χαρακτήρα της. Αρχικά, τα επίπεδα έκφρασής της διαμορφώνονται συναρτήσει των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, σημειώνοντας αύξηση σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα και μείωση σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας ή που λόγω αυξημένης πυκνότητας έχουν οδηγηθεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου (contact inhibition) (Carlson *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 1999). Λειτουργικά, επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση ρυθμίζοντας τη φάση μετάβασης G2/M μέσω αλληλεπίδρασης με την κυκλίνη B και τον αναστολέα p21<sup>Cip1</sup>. Επίσης αλληλεπιδρά με μόρια που σχετίζονται με την απόπτωση και την επιδιόρθωση του DNA ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει την παραγωγή της ιντερφερόνης γ σε κύτταρα του ανοσοποιητικού (Trotta *et al.*, 2007). Σημαντική είναι η δράση της SET αναφορικά με τη μετάσταση καθώς, αφενός αναστέλλει την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη NM23-H1, η οποία παρεμποδίζει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και αφετέρου μέσω της Rac1 την προωθεί. Επιπλέον στην T-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, μέσω της σύντηξής της με τη νουκλεοπορίνη Nup214, ενεργοποιεί την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων *HOXA*

(*Homeobox A Cluster*), αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει τη διαφοροποίηση (Van Vlierberghe *et al.*, 2008).

Ο ρόλος της SET στην αναστολή της φωσφατάσης PP2A, ίσως αποτελεί τον πιο σημαντικό μηχανισμό δράσης της στην ογκογένεση. Η PP2A όπως περιγράφηκε παραπάνω, είναι μία εκ των σημαντικότερων φωσφατασών στο κύτταρο καθώς εμπλέκεται σε πλήθος κυτταρικών διαδικασιών, όπως η μεταγωγή σήματος, η απόπτωση, η απόκριση σε συνθήκες stress και ο κυτταρικός κύκλος. Διακριτός είναι ο ρόλος της και στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το Wnt το οποίο επηρεάζει την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την κυτταρική αύξηση, καθώς επίσης την επιβίωση και αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων (Perrotti and Neviani, 2013). Η PP2A έχει ογκοκατασταλτική δράση όπως επιβεβαιώνει η απενεργοποίησή της σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η αναστολή της από ενδογενείς παράγοντες όπως η SET, οδηγεί στην ογκογένεση μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών όπως MAPK, ERK και c-Jun (JNK) (Al-Murrani *et al.*, 1999; Kandilci and Grosveld, 2005).

Εξαιτίας των πολλαπλών και διαφορετικών ρόλων της SET σε μονοπάτια που επάγουν την ογκογένεση και τη μετάσταση, η φαρμακολογική στόχευση της ογκοπρωτεΐνης θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως μια νέα προσέγγιση στην αντικαρκινική θεραπεία.

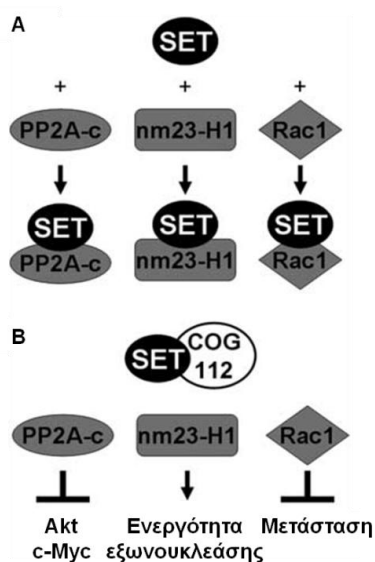
### **1.7. Η SET ως μόριο-στόχος φαρμάκων**

Η αξιοποίηση της Απολιποπρωτεΐνης E (ApoE) και των ApoE-μιμητικών πεπτιδίων συνέβαλε στην ανάπτυξη μιας νέας θεραπευτικής προσέγγισης έναντι της δράσης της SET στον καρκίνο. Η ApoE είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη, γνωστή για τον ρόλο της στη μεταφορά της χοληστερόλης. Επιπλέον, δρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Ο ρόλος της ApoE στην ανοσορύθμιση μελετήθηκε εκτενέστερα με την κατασκευή συνθετικών πεπτιδίων τα οποία μιμούνται τη δράση της στην καταστολή της ανοσοαπόκρισης. Στα πλαίσια αυτά διαπιστώθηκε ότι τόσο η ολοπρωτεΐνη ApoE όσο και τα πεπτίδια συνδέονται με την SET και πως η περιοχή της SET που μεσολαβεί αυτή την αλληλεπίδραση βρίσκεται στο καρβοξυτελικό της άκρο (aa 177-277). Συνέπεια της σύνδεσης των δύο μορίων είναι η ενεργοποίηση της PP2A και η επακόλουθη αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών-στόχων της (Christensen *et al.*, 2011).

### 1.7.1. COG112 (OP449)

Η ανταγωνιστική δράση των πεπτιδίων έναντι της SET συνιστά έναν μηχανισμό με πολλαπλά οφέλη στην καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων. Το COG112 είναι ένα χημειοθεραπευτικό πεπτίδιο ο σχεδιασμός του οποίου έγινε με βάση μια μικρή περιοχή της ApoE και την προσθήκη μιας περιοχής της πρωτεΐνης Antennapedia για την διευκόλυνση της εισόδου του στο κύτταρο (acetyl-RQIKIWFQNRMKWKKCLRVRLASHLRKLRKRL-amide). Το COG112 αλληλεπιδρά με τη SET και προκαλεί διάσπαση του συμπλόκου που σχηματίζει με την καταλυτική υπομονάδα της PP2A. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνει την ενεργότητα της PP2A και οδηγεί στη μείωση της σηματοδότησης Akt και c-Myc παρεμβαίνοντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ομοίως συμβαίνει και με την NM23-H1. Η δέσμευση της SET από το πεπτίδιο επιτρέπει τη μετακίνηση της εξωνουκλεάσης στον πυρήνα και ενισχύει τη δράση της ως ογκοκατασταλτικό μόριο. Παράλληλα επηρεάζει αρνητικά την ικανότητα μετάστασης και διήθησης των καρκινικών κυττάρων παρεμποδίζοντας τη σύνδεση της SET με τη Rac1 (Εικόνα 1.8) (Switzer *et al.*, 2011).

Η επίπτωση της αναστολής της SET λόγω της ανταγωνιστικής δράσης αυτού του πεπτιδίου στον καρκίνο μελετήθηκε εκτενέστερα με τη χρήση του OP449 (διμερής μορφή του COG112). Το πεπτίδιο αλληλεπιδρά και με τις δύο ισομορφές της SET και έχει κυτταροτοξική δράση ιδιαίτερα στις περιπτώσεις Χρόνιας και Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας (CML, AML) (Agarwal *et al.*, 2014). Επιπλέον η έκθεση κυττάρων καρκίνου του στήθους στο πεπτίδιο OP449, προκάλεσε μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του c-Myc και της μεταγραφικής του ενεργότητας (Janghorban *et al.*, 2014).



Εικόνα 1.8. Σχηματική περιγραφή των δράσεων της SET που αναστέλλει το πεπτίδιο COG112. (A) Η SET σχηματίζει σύμπλοκα με την PP2Ac, την NM23-H1 και τη Rac1. (B) Η σύνδεση του COG112 με τη SET αναστέλλει τη σηματοδότηση Akt και c-Myc, αυξάνει την ενεργότητα εξωνουκλεάσης της NM23-H1 και μειώνει τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων (Switzer *et al.*, 2011).

### 1.7.2. Fingolimod (FTY720)

Στα τέλη του 2010 η φινγκολιμόδη (Fingolimod, εμπορικό όνομα Gilenya, Novartis) εγκρίθηκε στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη ως η πρώτη φαρμακευτική ουσία σε μορφή χαπιού για τη μείωση των υποτροπών και την καθυστέρηση της εξέλιξης της αναπηρίας σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα μορφή σκλήρυνσης κατά πλάκας (ΣΚΠ). Η ΣΚΠ ή Πολλαπλή Σκλήρυνση είναι μία χρόνια, αυτοάνοση νόσος που προσβάλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα όταν λεμφοκύτταρα του οργανισμού διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και επιτίθενται στα νευρικά κύτταρα.

Η φινγκολιμόδη (αρχική ονομασία FTY720) αποτελεί συνθετικό ανάλογο της ουσίας myriocin (ISP-1), μεταβολίτη του μύκητα *Isaria sinclairii* και λόγω δομικής ομοιότητας με την σφιγγοσίνη δρα ως τροποποιητής των υποδοχέων της 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης. Μεταβολίζεται από την κινάση της σφιγγοσίνης 2 (SphK2) στο δραστικό μεταβολίτη φωσφορική φινγκολιμόδη (ή FTY720-P). Δρώντας ως λειτουργικός ανταγωνιστής των υποδοχέων S1P στα λεμφοκύτταρα, η φωσφορική φινγκολιμόδη αναστέλλει την ικανότητά τους να εξέρχονται από τους λεμφαδένες. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η μείωση της διήθησης παθογόνων λεμφοκυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπου θα συμμετείχαν στη φλεγμονή και στη βλάβη του νευρικού ιστού. Η δράση του φαρμάκου έγκειται στην απομόνωση των λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες, εμποδίζοντας τη μετανάστευση αυτών στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό και την πρόκληση των απομυελινωτικών βλαβών, που είναι υπεύθυνες για την κλινική νόσο (Brinkmann *et al.*, 2010; Chun and Brinkmann, 2011).

Ως ανάλογο της σφιγγοσίνης το FTY720 διατηρεί πολλές από τις λειτουργικές της ιδιότητες και επεκτείνει τις δράσεις του πέραν της ανοσοκαταστολής στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών και τον καρκίνο ενώ παράλληλα εντάσσεται στην κατηγορία φαρμάκων που ενεργοποιούν την PP2A μέσω αλληλεπίδρασης με την SET (Patmanathan *et al.*, 2015).

Η ενεργοποίηση της PP2A από κεραμίδια είναι γνωστή από το 1993 και παρότι υπάρχουν ενδείξεις αλληλεπίδρασης των λιπιδίων αυτών με την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου, η άμεση σύνδεση με τη SET θεωρείται ως πιθανότερος μηχανισμός ενεργοποίησης της φωσφατάσης (Oaks *et al.*, 2013). Η πρώτη μελέτη που αποδεικνύει την άμεση και ειδική σύνδεση της SET με τα κεραμίδια δημοσιεύθηκε το 2009. Σε πειράματα ανοσοκαταβύθισης που πραγματοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα κυττάρων καρκίνου του

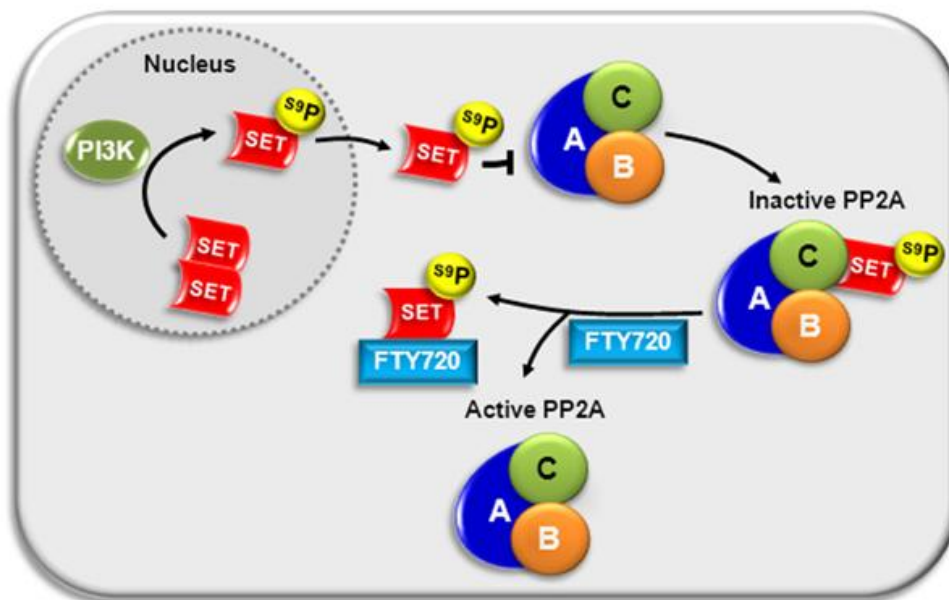
πνεύμονα βρέθηκε ότι η SET αλληλεπιδρά με το C<sub>6</sub>-κεραμίδιο και πως αυτή η αλληλεπίδραση καταργεί το σύμπλοκο SET-PP2Ac. Εμφανής απόδειξη της ενεργοποίησης της PP2A ήταν η μείωση των επιπέδων του c-Myc λόγω αποφωσφορλίωσης (Mukhopadhyay *et al.*, 2009). Αντίστοιχα, διαπιστώθηκε η σύνδεση της SET με το C<sub>18</sub>-κεραμίδιο σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα. Το FTY720 ως ανάλογο κεραμιδίου/σφιγγοσίνης στα συγκεκριμένα κύτταρα οδηγεί στην ενεργοποίηση της PP2A λόγω δέσμευσης της SET και κατά συνέπεια προκαλεί το θάνατο των καρκινικών κυττάρων και τη μείωση του όγκου *in vivo* (Saddoughi *et al.*, 2013). Η στόχευση του συμπλόκου SET-PP2Ac από το FTY720 και η επακόλουθη αύξηση της ενεργότητας της PP2A έχει δειχθεί και σε περιπτώσεις Οξείας και Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, αναδεικνύοντας τον ογκοκατασταλτικό του ρόλο σε διάφορους καρκίνους ως μορίου-ανταγωνιστή της πρωτεΐνης SET (Neviani *et al.*, 2013; Pippa *et al.*, 2014).

Η SET αναστέλλει την PP2A εφόσον συνδεθεί στην καταλυτική της υπομονάδα. Οι περιοχές που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση των δύο μορίων έχουν εντοπιστεί αμινοτελικά μεταξύ των αμινοξέων 25-119 (Saito *et al.*, 1999) και καρβοξυτελικά στην περιοχή 176-277, ενώ σημαντική στη σύνδεση και αναστολή της φωσφατάσης είναι και η συνεισφορά της βαλίνης 92 (Val92) (Arnaud *et al.*, 2011). Ο μηχανισμός δράσης του FTY720 στον καρκίνο περιλαμβάνει τη διάσταση του συμπλόκου SET-PP2Ac μέσω άμεσης σύνδεσης με την SET. Περαιτέρω χαρακτηρισμός αυτής της αλληλεπίδρασης σε δομικό επίπεδο με τη χρήση βιοχημικών και *in silico* μεθόδων, ανέδειξε τη σημασία της καρβοξυτελικής περιοχής της SET. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι το FTY720 συνδέεται σε μία υδρόφοβη περιοχή του σφαιρικού αμφιπαθούς τμήματος της SET (earmuff domain) και πως κρίσιμη γι' αυτή τη σύνδεση είναι η λυσίνη 209. Η αλληλεπίδραση της Lys209 με την τυροσίνη 122 (Tyr122) θεωρείται ότι δημιουργεί μία πύλη μέσω της οποίας ρυθμίζεται η είσοδος και η πρόσδεση του FTY720 (Pippa *et al.*, 2014; Saddoughi *et al.*, 2013).

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της SET έχει δεχθεί ότι έχει άμεση σχέση με την αναστολή της PP2A. Καθοριστικό ρόλο σε αυτή την περίπτωση παίζει η φωσφορλίωση της Ser9 από την CKII ή την PI3Kγ και η συσσώρευση της SET στο κυτταρόπλασμα (Vasudevan *et al.*, 2011; Yu G. *et al.*, 2013). Ως εκ τούτου διερευνήθηκε κατά πόσον επηρεάζει το FTY720 την υποκυτταρική κατανομή της SET και της PP2A. Προσθήκη του φαρμάκου σε καλλιέργεια κυττάρων HeLa, προκάλεσε την έντονη και ταχεία έξοδο της SET στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον πειράματα έδειξαν πως για τη μετακίνηση αυτή είναι



απαραίτητη η ενεργότητα της PP2A και της Rac1 καθώς εξέρχονται μαζί στο κυτταρόπλασμα και πως η έξοδος μεσολαβείται από την CRM1. Η κατάσταση της φωσφορυλίωσης της SET δεν φάνηκε να επηρεάζει την έξοδό της στο κυτταρόπλασμα εφόσον παρουσία φαρμάκου μετακινήθηκαν εκτός του πυρήνα και τα δυο μεταλλάγματα SET-S9A και SET-S9E, μολονότι η SET-S9E κατανέμεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Επιπρόσθετα πειράματα με τη χρήση του φωσφορυλιωμένου αναλόγου FTY720-P δεν οδήγησαν σε αντίστοιχα αποτελέσματα (Lam *et al.*, 2013b). Αντίθετα ωστόσο ήταν τα αποτελέσματα στην περίπτωση κυττάρων Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας όπου η SET εντοπίζεται κανονικά στο κυτταρόπλασμα. Έκθεση των κυττάρων στο φάρμακο οδήγησε σε αυξημένη πυρηνική μετατόπιση της SET και ταυτόχρονη αύξηση της κυτταροπλασματικής PP2Ac (Pirra *et al.*, 2014). Στην Εικόνα 1.9 περιγράφεται ένας πιθανός μηχανισμός ανταγωνιστικής αναστολής της SET από το FTY720 μετά από πρόσδεση του φαρμάκου στην πρωτεΐνη, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της PP2A.

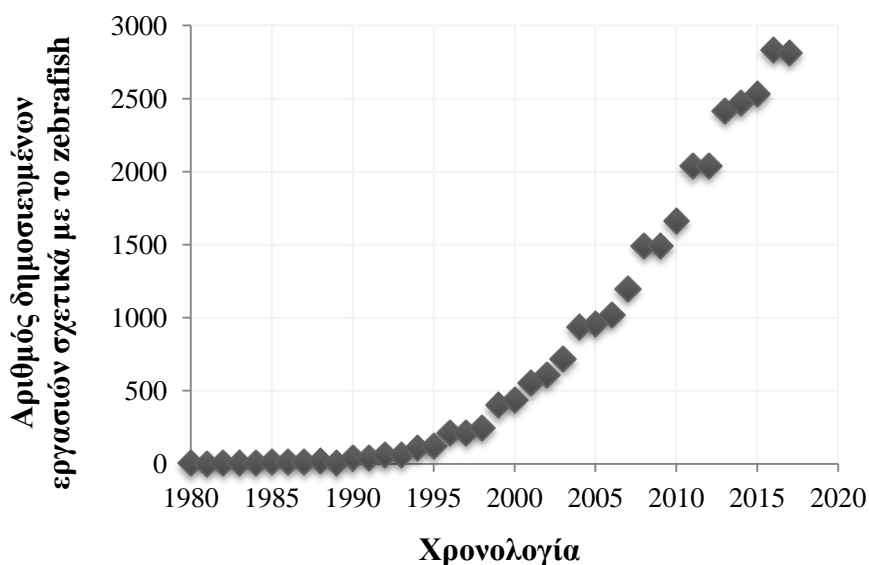


**Εικόνα 1.9.** Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του FTY720 στην ανταγωνιστική αναστολή της SET και την επακόλουθη ενεργοποίηση της PP2A (Arriazu *et al.*, 2016).

## Ο πρότυπος οργανισμός zebrafish (*Danio rerio*)

### 2.1. Εδραίωση του zebrafish ως πειραματικό μοντέλο

Το zebrafish για μεγάλο χρονικό διάστημα αποτέλεσε σημαντικό ερευνητικό μοντέλο στο πεδίο της Αναπτυξιακής Βιολογίας μέχρι και τη δεκαετία του 1990, οπότε και άρχισε να επεκτείνεται η χρήση του και σε άλλους τομείς. Πλέον έχει καθιερωθεί ως ένα αξιόλογο σύστημα για την διεξαγωγή *in vivo* πειραμάτων στη Νευροβιολογία, τη Γενετική, την Τοξικολογία και γενικότερα στον τομέα των Βιοεπιστημών. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί κατακόρυφη άνοδος των βιβλιογραφικών αναφορών που σχετίζονται με το zebrafish, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο αριθμός των επιστημόνων που επιλέγουν τον συγκεκριμένο οργανισμό-μοντέλο συνεχώς αυξάνεται (Εικόνα 2.1, Πηγή: Pubmed).



**Εικόνα 2.1.** Η αύξηση της χρήσης του zebrafish στην έρευνα αναπαρίσταται γραφικά ως ο αριθμός των βιβλιογραφικών αναφορών για κάθε έτος από το 1980 έως το 2017. Ο όρος «zebrafish» χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση στη βάση δεδομένων Pubmed.

Η ευρεία εξάπλωση του zebrafish οφείλεται αφενός στα σημαντικά του πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους οργανισμούς-μοντέλα και αφετέρου στη σημαντική πρόοδο που έχει σημειωθεί στην ανάπτυξη μεθόδων γενετικής ανάλυσης.

Αρχικά με την εφαρμογή τεχνικών που εισάγουν τυχαίες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του zebrafish κατασκευάστηκαν πολλά μεταλλαγμένα στελέχη, τα οποία στη

συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή των επαγόμενων φαινοτυπικών αλλαγών και τελικά τον χαρακτηρισμό του γενετικού τους υποβάθρου (ορθόδρομη γενετική ανάλυση, forward genetics). Επιπλέον καθοριστικής σημασίας ήταν η αποκωδικοποίηση του DNA του zebrafish από το Ινστιτούτο Sanger, εφόσον άνοιξε το δρόμο για τον σχεδιασμό και τη δημιουργία νέων μεθόδων που αφορούν την τροποποίηση γονιδίων-στόχων. Συγκεκριμένα με αυτόν τον τρόπο μπορεί κάποιος να επέμβει στη διαδικασία γονιδιακής έκφρασης και στη συνέχεια μετά από φαινοτυπική ανάλυση να προσδιορίσει τη λειτουργία του εκάστοτε γονιδίου (ανάδρομη γενετική ανάλυση, reverse genetics). Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με μικροέγχυση ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης και η στοχευμένη μεταλλαξιγένεση με το σύστημα CRISPR. Επιπλέον κατέστησε εφικτή την ανάπτυξη μικροσυστοιχιών επιτρέποντας την ανάλυση γενετικών αλλαγών σε επίπεδο μεταγραφώματος.

Όσα προαναφέρθηκαν δεν θα ήταν εφικτά αν το zebrafish δεν διέθετε κάποια χαρακτηριστικά τα οποία και αποτελούν ορισμένα από τα βασικά του πλεονεκτήματα. Ενδεικτικά αναφέρονται το μικρό μέγεθος των ενήλικων ατόμων, ο συνεχής αναπαραγωγικός κύκλος, η παραγωγή μεγάλου αριθμού αυγών σε κάθε ωοτοκία (150-400), το υψηλό ποσοστό γονιμοποίησης καθώς και το μικρό κόστος συντήρησης και διάθεσης χώρου που απαιτείται. Ακόμη σαν οργανισμός παρουσιάζει πολύ γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης, γεννά μεγάλα αυγά το μέγεθος των οποίων επιτρέπει τον εύκολο χειρισμό τους και διάφανα διευκολύνοντας έτσι την λεπτομερειακή παρατήρηση των διαφόρων δομών και οργάνων κατά την ανάπτυξη.

Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ανάλυσης τοξικότητας εφόσον παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με διάφορα είδη θηλαστικών καθώς και με τον άνθρωπο (Hill *et al.*, 2005). Τέλος, αποτελεί ένα κατάλληλο πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη των μηχανισμών που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες καθώς και για τη δοκιμή νέων φαρμάκων (Ali *et al.*, 2011).

## **2.2. Γενικές πληροφορίες**

Η αρχική ταυτοποίηση και καταγραφή του zebrafish έγινε στον ποταμό Γάγγη το 1822 από τον Francis Hamilton από τον οποίο και εδόθη η επιστημονική ονομασία *Danio rerio*. Πρόκειται για παμφάγο οργανισμό ο οποίος τρέφεται με ζωοπλαγκτόν, πρωτόζωα καθώς και με προνύμφες ή αυγά εντόμων (Spence *et al.*, 2007).

### 2.3. Φυσικό οικοσύστημα και γεωγραφική εξάπλωση

Το zebrafish είναι τροπικό ψάρι του γλυκού νερού και ανήκει στην πιο πλούσια σε είδη οικογένεια σπονδυλωτών, αυτή των Κυπρινοειδών. Μέχρι στιγμής έχουν καταγραφεί 45 είδη, τα οποία κατανέμονται καθ' όλο το μήκος της νότιας και νοτιοανατολικής Ασίας, από το Πακιστάν έως το δυτικό άκρο της Μιανμάρ και από το Νεπάλ έως την περιοχή της Καρνατάκα, με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία να απαντάται στις περιοχές του Μπαγκλαντές και της Μιανμάρ. Οι φυσικοί πληθυσμοί διαβιούν κυρίως σε ποτάμια, ρυάκια, λίμνες και κανάλια και συγκεκριμένα σε περιοχές όπου τα υδάτινα ρεύματα είναι στατικά ή χαμηλής ροής με ταχύτητες 0-0.1 m/sec. Οι υδάτινες περιοχές στις οποίες ενδιαιτεί το zebrafish χαρακτηρίζονται από εύρος θερμοκρασιών 27- 34 °C και pH 7.9-8.2, αβαθή και σχετικά καθαρά νερά ενώ το υπόστρωμα του εδάφους μπορεί να είναι αργιλώδες, αμμώδες ή πετρώδες (Engeszer *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2008).

### 2.3. Συστηματική κατάταξη

Το *Danio rerio* αποτελεί είδος ενός αρκετά διαφοροποιημένου γένους που περιλαμβάνει συνολικά 25 περίπου είδη . Η συστηματική κατάταξη του είδους αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Συστηματική κατάταξη του οργανισμού *Danio rerio*.

<b>Βασίλειο</b>	Ζώα ( <i>Animalia</i> )
<b>Φύλο</b>	Χορδωτά ( <i>Chordata</i> )
<b>Υποφύλο</b>	Σπονδυλωτά ( <i>Vertebrata</i> )
<b>Υπερομοταξία</b>	Γναθοστόματα ( <i>Gnathostomata</i> )
<b>Ομοταξία</b>	Ακτινοπτερύγια ( <i>Actinopterygii</i> )
<b>Υφομοταξία</b>	Τελεόστεοι ( <i>Teleostei</i> )
<b>Τάξη</b>	Κυπρινόμορφοι ( <i>Cypriniformes</i> )
<b>Οικογένεια</b>	Κυπρινοειδή ( <i>Cyprinidae</i> )
<b>Γένος</b>	<i>Danio</i>
<b>Είδος</b>	<i>rerio</i>

## 2.4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το χαρακτηριστικό μορφολογικό γνώρισμα του zebrafish στο οποίο οφείλει το όνομά του είναι οι οριζόντιες ρίγες που εκτείνονται πλευρικά κατά μήκος του σώματός του έως και το ουριαίο πτερύγιο. Πρόκειται για 5 εναλλασσόμενες μπλε/μαύρες γραμμές αποτελούμενες από μελανοφόρα και ιριδοφόρα κύτταρα και ασημί/χρυσές γραμμές αποτελούμενες από ξανθοφόρα και ιριδοφόρα κύτταρα. Τα zebrafish προσαρμόζουν τα επίπεδα μελάγχρωσής τους σύμφωνα με το εκάστοτε περιβάλλον ως μέσο αυτοπροστασίας στα πλαίσια αποφυγής θηρευτών.

Ως οργανισμοί παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό αύξησης κατά τους πρώτους 3 μήνες της ανάπτυξής τους μετά την εκκόλαψη, οι οποίοι μειώνονται και σταθεροποιούνται μέχρι και την ηλικία των 18 μηνών. Η διάρκεια ζωής τους κυμαίνεται μεταξύ 2-3 χρόνων ενώ ο αριθμός αυτός αυξάνεται μέχρι και τα 5 έτη σε συνθήκες εργαστηρίου. Αντίθετα στη φύση μειώνεται σημαντικά λόγω θανάτου προκαλούμενου από θηρευτές ή παράσιτα. Το μέγεθος του σώματος των ενήλικων ατόμων δεν ξεπερνά τα 4 cm ενώ διαφορές εντοπίζονται μεταξύ των θηλυκών και των αρσενικών ατόμων ως προς συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Τα δύο φύλα διακρίνονται λόγω διαφορετικού σωματότυπου. Πιο συγκεκριμένα, τα αρσενικά είναι περισσότερο επιμήκη ενώ τα θηλυκά έχουν μεγαλύτερο σώμα και διογκωμένη κοιλιά λόγω εναπόθεσης μεγάλου αριθμού ωαρίων. Επιπλέον διαφέρουν και στο πρότυπο μελάγχρωσης εφόσον το αρσενικό είναι λίγο πιο σκούρο με μπλε/χρυσές ρίγες έναντι των μπλε/ασημί του θηλυκού (Εικόνα 2.2) (Gerhard *et al.*, 2002; Spence *et al.*, 2007).



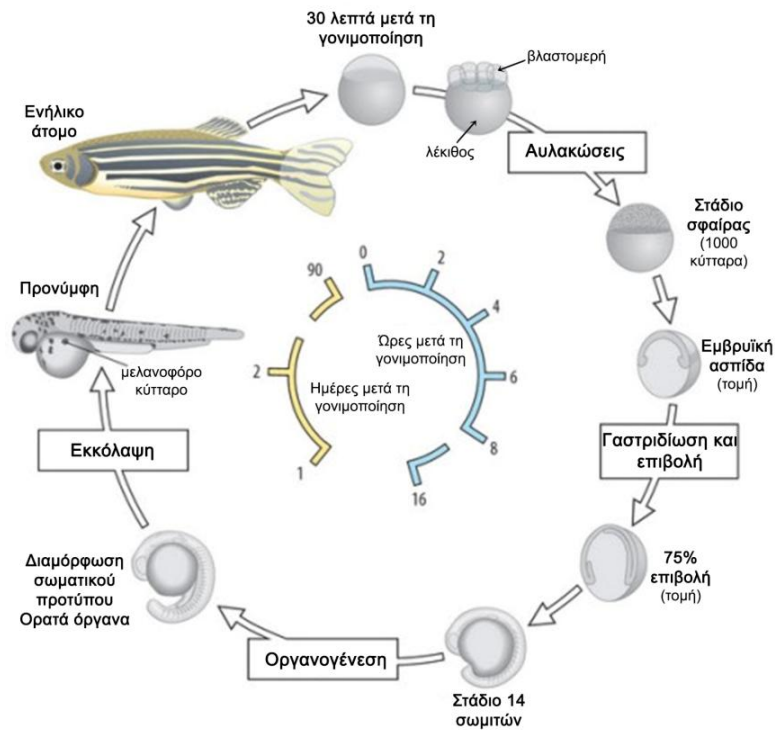
Εικόνα 2.2. Ενήλικα άτομα zebrafish (αρσενικό αριστερά, θηλυκό δεξιά).

## 2.5. Κύκλος ζωής και αναπαραγωγή

Το zebrafish είναι ωοτόκος οργανισμός και παρουσιάζει ασύγχρονη ωρίμανση γονάδων. Αρχικά οι γονάδες όλων των ατόμων αναπτύσσονται ως πρόδρομες ωοθήκες και στις 3-4 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση ξεκινά στα γενετικά αρσενικά άτομα η διαδικασία της διαφοροποίησης σε όρχεις η οποία ολοκληρώνεται με την ωρίμανσή τους κατά τον τρίτο μήνα ανάπτυξης. Το ζευγάρι μεταξύ αρσενικών και θηλυκών zebrafish στη φύση χαρακτηρίζεται από εποχικότητα η οποία ωστόσο διαταράσσεται υπό συνθήκες εργαστηριακού περιβάλλοντος, ενώ είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από την φωτοπερίοδο. Η δραστηριότητα των ψαριών χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο ημερήσιο πρότυπο εφόσον συγχρονίζεται με τον κύκλο φωτός/σκότους και λήψης τροφής. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι τόσο στη φύση όσο και στο εργαστήριο, η αναπαραγωγική διαδικασία ξεκινά αμέσως μετά την ανατολή του ηλίου ή την έναρξη της περιόδου φωτός. Στα πλαίσια της αναπαραγωγής ακολουθείται μια τελετουργία ζευγαρώματος, κατά τη οποία τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά άτομα επιδεικνύουν συγκεκριμένη συμπεριφορά. Τα αρσενικά άτομα κυνηγούν τα θηλυκά ενώ παράλληλα με το ρύγχος τους ασκούν μικρές πιέσεις στην περιοχή της κοιλιάς τους ώστε να επάγουν την ωοτοκία (Spence *et al.*, 2008). Η ανταπόκριση των θηλυκών και τελικά η απελευθέρωση των ωοκυττάρων εξαρτάται από την έκθεσή τους σε φερομόνες που προέρχονται από τις γονάδες των αρσενικών (στεροειδή γλυκουρονίδια), οι οποίες διαχέονται στο νερό και γίνονται αντιληπτές από τα θηλυκά μέσω του οσφρητικού επιθηλίου (van den Hurk and Resink, 1992; von Hofsten and Olsson, 2005). Αντίστοιχα, τα θηλυκά άτομα εκκρίνοντας από τις ωοθήκες τους όμοιες φερομόνες ελκύουν τα αρσενικά άτομα και επηρεάζουν με αυτόν τον τρόπο τη συμπεριφορά τους (van den Hurk and Lambert, 1983).

Κατά την ωοτοκία ένα ώριμο θηλυκό άτομο μπορεί να αποθέσει μέχρι και 400 αυγά, τα οποία είναι διάφανα και η διάμετρός τους είναι περίπου 0.7 mm. Αμέσως μετά την γονιμοποίηση, το κυτταρόπλασμα του αυγού συσσωρεύεται στον ζωικό πόλο, όπου περιβάλλει τον πυρήνα του ζυγωτού. Το κυτταροπλασματικό τμήμα του αυγού και όχι το λεκιθικό, είναι αυτό που υποβάλλεται σε διαιρέσεις. Η εκκόλαψη πραγματοποιείται μεταξύ 48-72 ωρών μετά τη γονιμοποίηση, ανάλογα με το πάχος του χορίου (chorion) και τη μυική δραστηριότητα του εμβρύου, όταν η θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται τα έμβρυα είναι 28.5 °C. Αμέσως μετά την εκκόλαψη οι προνύμφες προσκολλώνται σε σκληρές επιφάνειες μέσω κυττάρων της επιδερμίδας του κεφαλιού με σκοπό τη σταδιακή

ανοδό τους στην επιφάνεια η οποία θα τους επιτρέψει πρόσβαση σε τροφή και ταυτόχρονα θα οδηγήσει στη διόγκωση της νυκτικής τους κύστης. Παράλληλα ο σχηματισμός στόματος καθιστά εφικτή τη λήψη τροφής. Η ωρίμανση των ατόμων και η μετάβαση στην ενηλικίωση πραγματοποιείται κατά τον 3-4 μήνα ανάπτυξης (Kimmel *et al.*, 1995). Τα παραπάνω στάδια που χαρακτηρίζουν τον κύκλο ζωής του zebrafish παρουσιάζονται συνοπτικά στην Εικόνα 2.3, ενώ περιγράφονται αναλυτικά στην επόμενη ενότητα.



**Εικόνα 2.3. Κύκλος ζωής zebrafish.** Η εμβρυϊκή ανάπτυξη εξελίσσεται ταχύτατα εντός 48 ωρών μετά τη γονιμοποίηση. Η εκκόλαψη του εμβρύου σηματοδοτεί την έναρξη των προνυμφικών σταδίων που οδηγούν στην ωρίμανση και ενηλικίωση του ατόμου κατά το διάστημα των 3-4 μηνών. (Πηγή: Wolpert L. *et al.*, 2002 Principles of development 2nd Ed. New York: Oxford University Press.)

## 2.6. Εμβρυογένεση και πρόιμη ανάπτυξη

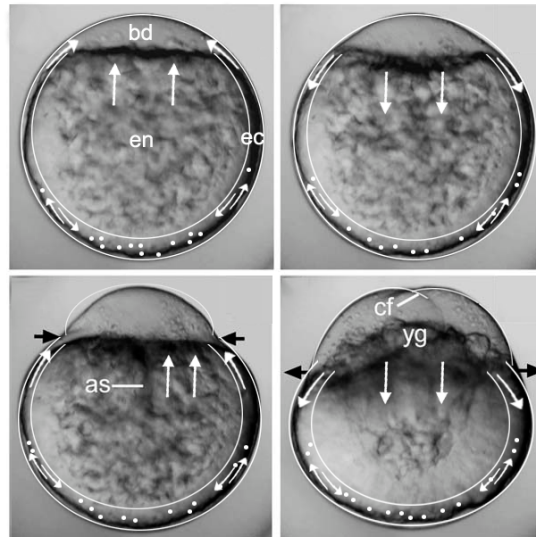
Η εμβρυική ανάπτυξη από την γονιμοποίηση του αυγού έως την εκκόλαψη εκτιμάται χρονικά σε ώρες μετά την γονιμοποίηση του αυγού (hours post fertilization, hpf), ενώ μετά την εκκόλαψη όπου το έμβρυο χαρακτηρίζεται πλέον προνύμφη το στάδιο ανάπτυξης εκτιμάται σε ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (days post fertilization, dpf).

Η αναπαραγωγή των zebrafish ξεκινά με την απελευθέρωση των γαμετών από τα θηλυκά και τα αρσενικά άτομα και την *ex utero* γονιμοποίηση των ωοκυττάρων. Τα αυγά του zebrafish ενεργοποιούνται στο νερό ακόμη και απουσία σπέρματος ωστόσο η ανάπτυξη τους διακόπτεται έπειτα από κάποιες διαιρέσεις. Στα σπονδυλωτά η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου αποτελεί το έναυσμα για την έναρξη της 2ης μειωτικής διαίρεσης. Ακολούθως οι προπυρήνες του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου συντήκονται και σχηματίζεται το ζυγωτό. Μορφολογικά τα αυγά του zebrafish είναι μικρά σε μέγεθος, σφαιρικά και πολωμένα κατά μήκος του κατακόρυφου άξονά τους (τελολεκιθικά, telolecithal) καθώς διαχωρίζονται στο ζωικό ημισφαίριο (animal hemisphere) το οποίο είναι κυτταροπλασματικής σύστασης και το φυτικό ημισφαίριο (vegetal hemisphere) το οποίο είναι πλούσιο σε λέκιθο.

### *Εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης*

Η πορεία ανάπτυξης του οργανισμού ξεκινά με την πρώτη **αυλάκωση (cleavage)** η οποία πραγματοποιείται περίπου 30-40 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση, είναι μεροβλαστική καθώς συντελείται μόνο στην περιοχή του ζωικού πόλου (blastodisc) και δισκοειδής. Η αυλάκωση διαφέρει από την μιτωτική διαίρεση καθώς απουσιάζει η φάση αύξησης μεταξύ των διαδοχικών διαιρέσεων με αποτέλεσμα το μέγεθος των θυγατρικών κυττάρων/βλαστομερών να μειώνεται κάθε φορά κατά το ήμισυ. Αμέσως μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου πυροδοτούνται αλλαγές που αφορούν τη μετακίνηση μορίων και κυτταροπλασματικών καθοριστών από και προς το βλαστοδίσκο τόσο μέσω του ενδοπλάσματος του λεκιθικού κυττάρου όσο και περιφερειακά μέσω του εκτοπλάσματος. Ενώ παράλληλα η ανακατανομή των συστατικών διευκολύνεται και από τη συνεχώς εναλλασσόμενη συστολή/διαστολή του δακτυλίου που σχηματίζει ο κυτταροσκελετός ακτίνης (Εικόνα 2.4) (Fuentes and Fernandez, 2010).





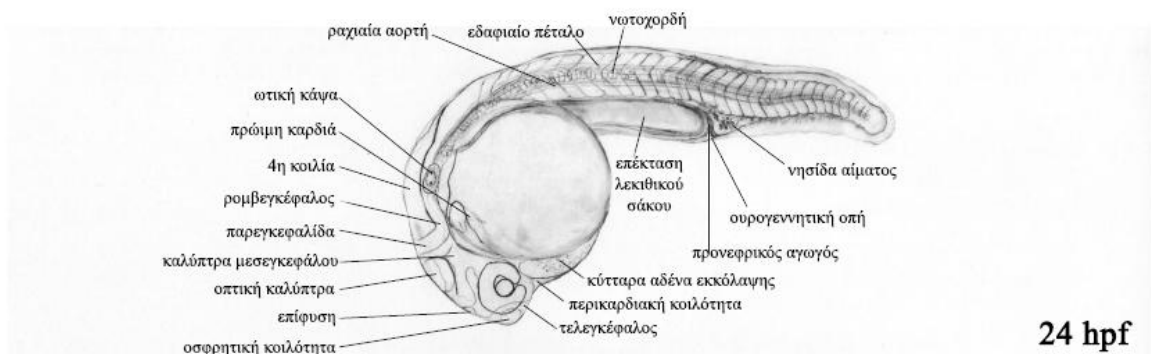
**Εικόνα 2.4. Αρχικά στάδια ανάπτυξης του ζυγωτού zebrafish.** Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου ζυγωτού από τη γονιμοποίηση έως και την πρώτη αυλάκωση. Διαγραμματικά απεικονίζεται με βέλη η συστολή/διαστολή του δακτυλίου της ακτίνης όπως και η κατεύθυνση της ροής (as) κυτταροπλασματικών συστατικών από και προς το βλαστοδίσκο (bd) κατά μήκος του εκτοπλάσματος (ec) και του ενδοπλάσματος (en) της λεκίθου.(cf: αύλακα, yg: λεκιθικά κοκκία) (Fuentes and Fernandez, 2010).

Οι αυλακώσεις επαναλαμβάνονται κάθε 15 λεπτά μέχρι τις 10 διαιρέσεις (~1.000 κύτταρα, 3 hpf) όταν και λαμβάνει χώρα η **μετάβαση μεσοβλαστιδίου** (midblastula transition MBT). Αυτή η φάση σηματοδοτεί τη λήξη της συνεισφοράς των γονιδίων μητρικής προέλευσης και την ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος μέσω έναρξης της μεταγραφής (maternal-to-zygotic transition, MZT, ~3.5-4 hpf). Ταυτόχρονα η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αυξάνεται και τα κύτταρα γίνονται πιο κινητικά. Ακολουθεί το στάδιο της **επιβολής (~5 hpf)** κατά το οποίο πραγματοποιείται επέκταση του βλαστοδέρματος.

Τα πρώτα στάδια της αναδίπλωσης καθορίζουν την αρχή της **γαστριδίωσης (5,25-10,33 hpf)**, η οποία εμφανίζεται στο 50% της επιβολής. Η γαστριδίωση οδηγεί στην εγκαθίδρυση της τυπικής δομής των τριών βλαστικών στιβάδων: του εξωδέρματος, του ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος. Από το εξώδερμα θα σχηματιστούν η επιδερμίδα, το νευρικό σύστημα, οι φακοί και τα αυτιά, από το μεσόδερμα προκύπτουν η νωτοχορδή, οι σωμίτες, οι νεφροί, το αίμα, τα αιμοφόρα αγγεία, η καρδιά, τα άκρα και οι γονάδες ενώ από το ενδόδερμα η επένδυση του εντερικού σωλήνα, το ήπαρ και το πάγκρεας (Kimmel *et al.*, 1995).

Μετά το πέρας της γαστριδίωσης, το έμβρυο εισέρχεται αναπτυξιακά στην **περίοδο μεταμερισμού ή σωματογένεσης (10,33-24 hpf)**. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από πληθώρα μορφογενετικών αλλαγών του εμβρύου όπως η ανάπτυξη των σωματιών ενώ οι καταβολές των πρόδρομων οργάνων πλέον γίνονται ορατές (Kimmel *et al.*, 1995).

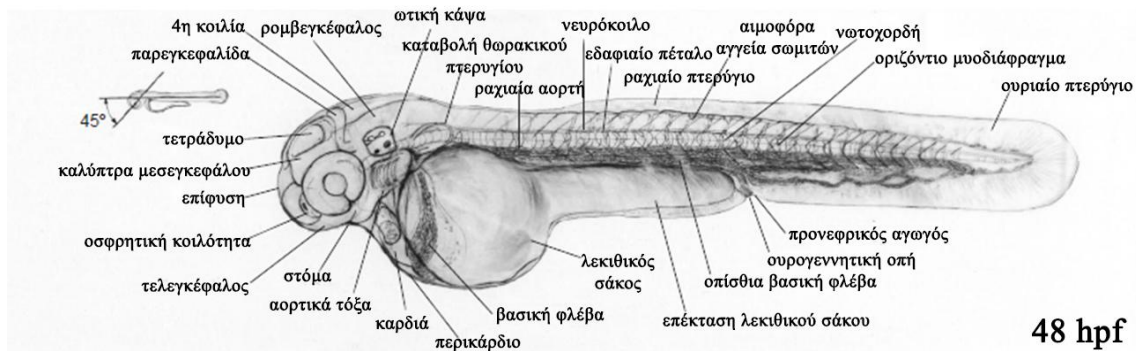
Στις 22 hpf η οπίσθια περιοχή του κορμού (posterior trunk) αρχίζει να ευθυγραμμίζεται ωστόσο αυτή η διαδικασία δεν είναι ολοκληρωμένη, εφόσον η ουρά καθώς συνεχίζει να επιμηκύνεται παρουσιάζει μια κάμψη κοιλιακά. Τα οσφρητικά πλακώδη επιθήλια εμφανίζονται εμπρόσθια και ραχιαία του πρόσθιου εγκεφάλου και η παρουσία των ωτόλιθων στην ωτική κοιλότητα είναι πλέον ορατή. Ακόμη είναι εμφανής η δημιουργία και η έναρξη της μετανάστευσης της πρόδρομης οπίσθιας πλευρικής γραμμής (posterior lateral line primordium, pLLp) προς την οπίσθια πτέρυγα του κορμού του εμβρύου. Επόμενη σημαντική αναπτυξιακή περίοδος είναι η **φαρυγγική (pharyngula, 24-48 hpf)**. Σε αυτήν την περίοδο ανάπτυξης η νωτοχορδή είναι καλά ανεπτυγμένη και έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των σωματιών στο σύνολό τους. Το νευρικό σύστημα επεκτείνεται σε όλο το σώμα και ο εγκέφαλος διαμορφώνει τέσσερις λοβούς. Στις πρώτες 24 ώρες ανάπτυξης η καρδιά έχει μορφή κωνικού σωλήνα, με περικαρδιακό σάκο και βρίσκεται μπροστά από το λεκιθικό σάκο (Εικόνα 1.14).



**Εικόνα 2.5.** Σχεδιαστική απεικόνιση της ανατομίας ενός ατόμου zebrafish στο εμβρυϊκό στάδιο των 24 hpf. (Haffter *et al.*, 1996).

Κατά το μεγαλύτερο μέρος αυτής της περιόδου, μέχρι και τις 40 hpf, προκειμένου να είναι εφικτός ο ακριβής προσδιορισμός του σταδίου στο οποίο βρίσκεται το έμβρυο, χρησιμοποιείται η οπτική Nomarski για τον εντοπισμό της θέσης της προπορευόμενης άκρης των αρχέγονων κυττάρων (primordium) της οπίσθιας πλευρικής γραμμής (pLLp), αποδίδοντας στα στάδια τον χαρακτηρισμό prim-stages.

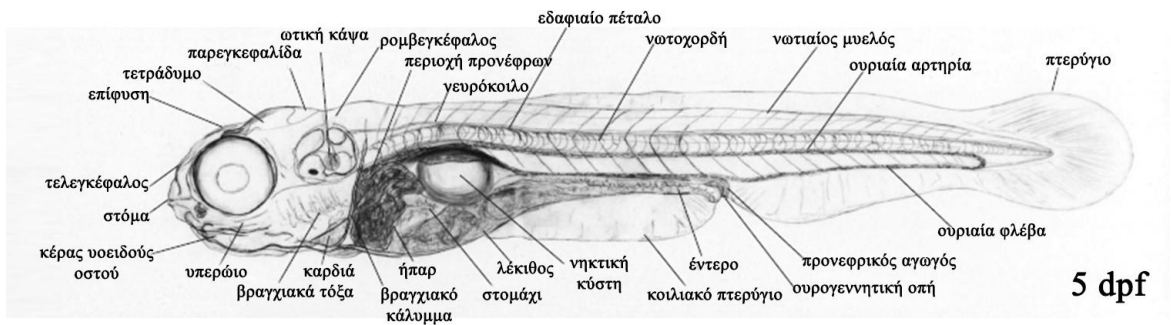
Στις 48 hpf το μέγεθος της λεκίθου έχει μειωθεί αρκετά. Τα οσφρητικά πλακώδια εντοπίζονται στα εμπρόσθια όρια των οφθαλμών ενώ σταδιακά διαφοροποιούνται προς συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους που στην κορυφαία τους επιφάνεια φέρουν κροσσούς ή μικρολάχνες με δυνατότητα παλμικής κίνησης. Τα κροσσωτά κύτταρα (hair cells) έχουν διαφοροποιηθεί στις αισθητήριες κηλίδες (sensory maculae) του ωτικού κυστιδίου. Τα όργανα της πλευρικής γραμμής, οι νευρομαστοί, είναι πλέον πλήρως σχηματισμένα και από την κορυφαία πλευρά των κροσσωτών κυττάρων προεκβάλλουν αισθητήριοι κροσσοί (sensory hairs). Στην Εικόνα 2.6 επισημαίνεται το σύνολο των αναπτυσσόμενων δομών (καταβολές) όσο και αυτών που έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξή τους μέχρι και τις 48 hpf.



**Εικόνα 2.6.** Σχεδιαστική απεικόνιση της ανατομίας ενός ατόμου zebrafish στο εμβρυϊκό στάδιο των 48 hpf. (Haffter *et al.*, 1996).

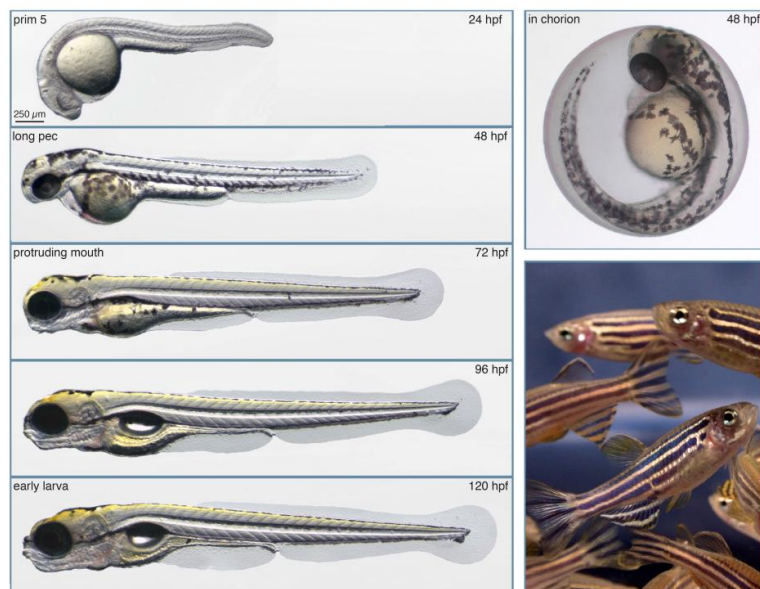
### Προνυμφικά στάδια ανάπτυξης

Κατά τη διάρκεια της περιόδου **εκκόλαψης (48-72 hpf)** οι ρυθμοί ανάπτυξης του εμβρύου zebrafish διατηρούνται στα ίδια επίπεδα. Η μορφογένεση πολλών οργάνων έχει σχεδόν ολοκληρωθεί ενώ σε κάποια άλλα όπως το έντερο, έχει επιβραδυνθεί αρκετά. Η διαφοροποίηση της νωτοχορδής έχει προχωρήσει ως το ουριαίο άκρο. Η εξάπλωση των μελανοφόρων είναι σαφής και διακριτή τόσο κατά το μήκος του σώματος όσο και στην περιοχή του κεφαλιού. Πέραν των ανατομικών και μορφολογικών αλλαγών το έμβρυο μεταβαίνει από την εμβρυϊκή στην **προνυμφική ανάπτυξη (72 hpf- 29 dpf)** καθώς απελευθερώνεται από το χόριο ξεκινά να κολυμπά ελεύθερα και να τρέφεται από το περιβάλλον. Στην περίοδο αυτή η προνύμφη δεν αποκτά πλήρως ενήλικη μορφή διότι η ανάπτυξη των πτερυγίων και των μελανοφόρων συνεχίζεται και ολοκληρώνεται στην περίοδο του νεαρού ατόμου. Τα ανατομικά χαρακτηριστικά της προνύμφης zebrafish (5 dpf) υποδεικνύονται στην Εικόνα 2.7.



**Εικόνα 2.7.** Σχεδιαστική απεικόνιση της ανατομίας ενός ατόμου zebrafish στο προνυμφικό στάδιο των 5 dpf. (Haffter *et al.*, 1996).

Μετά τον πρώτο μήνα ανάπτυξης το zebrafish παύει να θεωρείται προνύμφη και πλέον χαρακτηρίζεται **νεαρό άτομο (juvenile, 30-89 dpf)**. Σε αυτή τη φάση το zebrafish εμφανίζει χαρακτηριστικά ενήλικου ατόμου. Η ανάπτυξη του zebrafish ολοκληρώνεται με την **ενηλικίωσή** του η οποία τοποθετείται χρονολογικά μετά την ηλικία των 3-4 μηνών. Τη φάση αυτή σηματοδοτεί η αναπαραγωγική ωρίμανση των ατόμων ενώ τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους καθιστούν εφικτή τη διάκριση μεταξύ θηλυκών και αρσενικών. Στην Εικόνα 2.8, είναι εμφανείς οι μορφολογικές διαφορές που υφίσταται ο οργανισμός zebrafish ξεκινώντας από την εμβρυϊκή ανάπτυξη και καταλήγοντας στο ενήλικο άτομο.



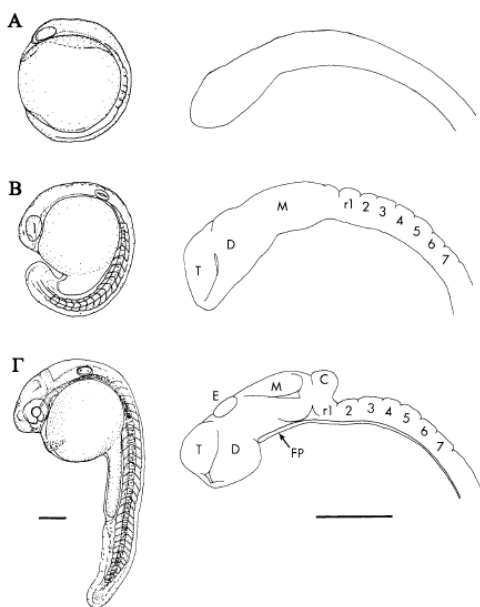
**Εικόνα 2.8.** Τα στάδια ανάπτυξης του zebrafish (24 hpf – ενήλικο άτομο) (Kimmel *et al.*, 1995).

## 2.7. Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών είναι η εξειδίκευση του νευροεξωδέρματος. Αυτή η διαδικασία καλείται νευρωνική επαγωγή και πραγματοποιείται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η νευρωνική επαγωγή στηρίζεται σε ένα σύνολο αλληλεπιδράσεων μεταξύ εξωγενών σηματοδοτικών παραγόντων όπως τα μέλη της οικογένειας BMP (Bone Morphogenetic Protein), WNT (Wingless Integrated) και FGF (Fibroblast Growth Factor) και ενδογενών μεταγραφικών παραγόντων με χαρακτηριστικότερα τα μέλη της οικογένειας SoxB1 (SRY-box containing genes B1) (Schmidt *et al.*, 2013).

Ο πρόδρομος ιστός του κεντρικού νευρικού συστήματος ξεκινά να σχηματίζεται καθώς η νευρική πλάκα αρχίζει να πτυχώνεται. Κατά τη διάρκεια το πρώτου μισού της σωματογένεσης διακρίνονται δέκα περίπου διογκώσεις, τα νευρομερή. Τρία χαρακτηριστικά νευρομερή λόγω του μεγέθους τους είναι ο διεγκεφαλος (diencephalon) και ο τελεγκέφαλος (telencephalon), που αποτελούν υποδιαιρέσεις του πρόσθιου εγκεφάλου (forebrain) και ο μεσεγκέφαλος (midbrain). Τα υπόλοιπα επτά καλούνται ρομβομερή (r1-r7) και υποδιαιρούν τον οπίσθιο εγκέφαλο ή ρομβεγκέφαλο (hindbrain) (Εικόνα 2.9B,Γ). Λίγο μετά τη μορφογένεση αρχίζει η διαφοροποίηση των πρώτων νευρώνων (neurons). Για πρώτη φορά τα κύτταρα διαφοροποιούνται μορφολογικά και το έμβρυο κάνει τις πρώτες αντανακλαστικές κινήσεις του.



**Εικόνα 2.9. Σταδιακή ανάπτυξη των λοβών του εγκεφάλου κατά την περίοδο της σωματογένεσης. (A)** Στο στάδιο των 6 σωματιών (12 hpf) δεν έχουν αναπτυχθεί ακόμη οι μορφολογικές υποδιαιρέσεις του εγκεφάλου. **(B)** Στο στάδιο των 18 σωματιών (18 hpf) έχουν σχηματιστεί 10 νευρομερή (T: τελεγκέφαλος, D: διεγκεφαλος, M: μεσεγκέφαλος και 7 ρομβομερή r1-r7). **(Γ)** Στις 24 hpf είναι εμφανής η επίφυση (E) στο μέσο της κορυφής του διεγκεφάλου, η επέκταση του διεγκεφάλου κοιλιακά αποτελεί την καταβολή του υποθαλάμου, ο μεσεγκέφαλος διαχωρίζεται σε ραχιαίο (tectum ή τετράδυμο) και κοιλιακό (tegmentum ή καλύπτρα), η παρεγκεφαλίδα (C) εμφανίζεται στο όριο μεταξύ μεσεγκεφάλου και οπίσθιου εγκεφάλου και το οροφιαίο πέταλο (FP) εκτείνεται κοιλιακά μέχρι τον πρόσθιο εγκέφαλο (Kimmel, 1993).

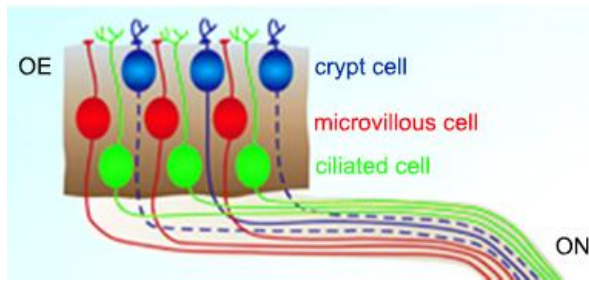
### **2.7.1. Ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων**

Το zebrafish όπως και όλοι οι σπονδυλωτοί οργανισμοί, διαθέτει όλες τις βασικές αισθήσεις όπως γεύση, αφή, όσφρηση, όραση, ακοή και ισορροπία. Υπεύθυνα γι' αυτές τις λειτουργίες είναι τα αντίστοιχα αισθητήρια όργανα τα οποία ξεκινούν να σχηματίζονται κατά την πρώιμη ανάπτυξη. Προέρχονται από τα κρανιακά πλακώδια, τα οποία εντοπίζονται εμπρόσθια της νευρικής πλάκας και πλευρικά της νευρικής ακρολοφίας.

#### **2.7.1.1. Οσφρητικό σύστημα**

Βασικός λειτουργικός ρόλος των οργάνων του οσφρητικού συστήματος είναι η αντίληψη μέσω της οσμής, πτητικών χημικών ενώσεων που προέρχονται από το περιβάλλον. Το οσφρητικό σύστημα των ψαριών επεξεργάζεται πλήθος διαφορετικών οσμών και ανταποκρίνεται σε αυτά τα ερεθίσματα υιοθετώντας συμπεριφορές καθοριστικής σημασίας για την επιβίωσή τους, που έχουν σχέση με την αναζήτηση τροφής, το ζευγάρισμα και την αναπαραγωγή όπως και την αποφυγή θηρευτών (Kermen *et al.*, 2013).

Αρχικά το οσφρητικό πλακώδιο, ένας ομογενής πληθυσμός αδιαφοροποίητων κυττάρων κάνει την εμφάνισή του στις 17 hpf όπου λίγο αργότερα μέσω εγκολπώσεων θα σχηματίσει κοιλότητες που θα αποτελέσουν τα ρουθούνια, η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μέχρι τις 32 hpf. Τα κύτταρα του πλακωδίου διαφοροποιούνται προς οσφρητικό επιθήλιο (OE) το οποίο χαρακτηρίζεται από κυτταρική διαστρωμάτωση καθώς αποτελείται από τρεις διακριτούς μορφολογικά τύπους κυττάρων, διευθετημένους σε διαφορετικά επίπεδα εντός του επιθηλίου. Αυτά είναι τα κροσσωτά κύτταρα (ciliated cells) που στην κορυφαία πλευρά τους φέρουν κροσσούς και έχουν μακρούς δενδρίτες, οι αισθητήριοι νευρώνες που φέρουν μικρολάχνες (microvillous cells) και τα κύτταρα κρύπτης (crypt cells) (Εικόνα 2.10). Παρότι τα σώματα των κυττάρων παραμένουν εντός του επιθηλίου, οι άξονές τους εκτείνονται μέσω του οσφρητικού νεύρου στο ΚΝΣ. Εκεί, οι νευράξονες των κυττάρων-υποδοχέων σχηματίζουν συνάψεις στο εσωτερικό των σφαιρικών οσφρητικών σπειραμάτων του οσφρητικού βολβού (OB) (Kermen *et al.*, 2013).



**Εικόνα 2.10. Οσφρητικό σύστημα zebrafish.** Οργάνωση του οσφρητικού επιθηλίου (OE) ως πολυκύτταρη δομή με χαρακτηριστική διάταξη. Το σύνολο των αξόνων των κυττάρων αποτελεί το οσφρητικό νεύρο (ON).

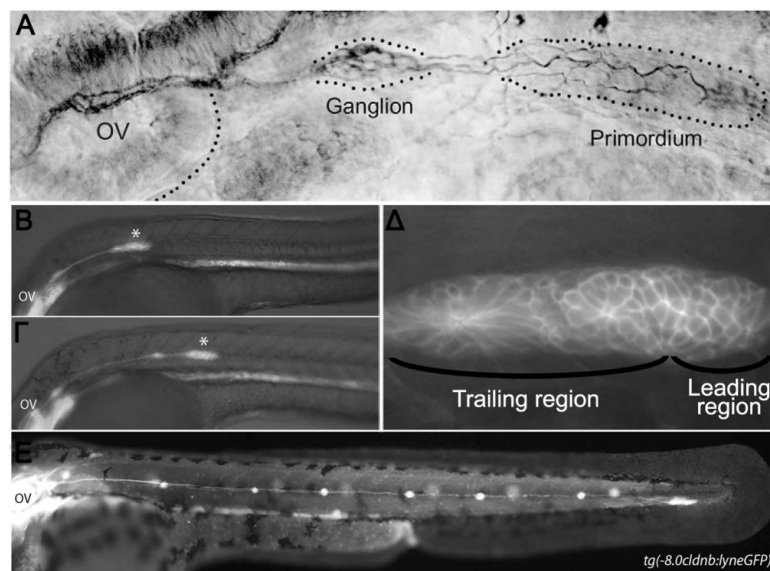
### 2.7.1.2. Σύστημα Πλευρικής Γραμμής

Τα υδρόβια ζώα που μετακινούνται αναπόφευκτα προκαλούν με την κίνησή τους μετατόπιση νερού και διακυμάνσεις πίεσης, με τις αλλαγές αυτές να αποτελούν υδροδυναμικά ερεθίσματα. Συνεπώς, τα υδροδυναμικά ερεθίσματα παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την επιβίωση των οργανισμών που διαβιούν στα υδάτινα οικοσυστήματα και είναι αναμφίβολα ο λόγος που τα περισσότερα υδρόβια ζώα έχουν αναπτύξει ένα εξαιρετικά εκλεπτυσμένο αισθητήριο σύστημα για την ανίχνευση αυτών των μεταβολών. Στα ψάρια και στα αμφίβια αυτό το σύστημα είναι η μηχανοαισθητήρια πλευρική γραμμή. Οι πληροφορίες που προσλαμβάνονται μέσω της πλευρικής γραμμής συμβάλλουν στον εντοπισμό της λείας τους, την πλοήγηση, την κολύμβηση σε κοπάδια και την αποφυγή θηρευτών (Bleckmann and Zelick, 2009).

Η πλευρική γραμμή αποτελείται από ένα σύνολο διακριτών οργάνων τα οποία καλούνται νευρομαστοί, λειτουργούν ως αισθητήριοι μηχανοϋποδοχείς και απαντώνται καθ' όλο το μήκος του σώματος του ψαριού. Το σύστημα της πλευρικής γραμμής αποτελείται από δύο βασικούς κλάδους, ο ένας εκ των οποίων εκτείνεται στην περιοχή του κεφαλιού και συνιστά το εμπρόσθιο τμήμα της πλευρικής γραμμής (anterior lateral line, aLL) και ο άλλος στην περιοχή του κορμού (trunk) και της ουράς αποτελώντας το οπίσθιο τμήμα της πλευρικής γραμμής (posterior lateral line, pLL). Τα δύο παραπάνω τμήματα aLL και pLL προέρχονται από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας και συγκεκριμένα από δύο κρνιακά πλακώδια, τοποθετημένα εκατέρωθεν του ωτικού πλακωδίου που εμφανίζονται στο στάδιο των 18 hpf (Εικόνα 2.11A) (Ghysen and Dambly-Chaudiere, 2004).

Το πλακώδιο από το οποίο θα σχηματιστεί η pLL διαιρείται σε μία ομάδα ~20 κυττάρων που θα αποτελέσει το γαγγλιακό νεύρο και σε μία ομάδα ~100 κυττάρων που αντιστοιχεί στο pLL primordium (pLLp) το οποίο μεταναστεύει προς την ουρά ακολουθώντας συγκεκριμένη πορεία κατά μήκος του οριζόντιου μυοδιαφράγματος, πάνω

στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας. Το pLLp ή primI ξεκινά να μεταναστεύει προς το ουριαίο περύγιο στις 20-22 hpf ενώ παράλληλα απελευθερώνοντας συστάδες ~20 κυττάρων εναποθέτει κατά μήκος του κορμού τους πρωτονευρομαστούς που τελικά θα διαφοροποιηθούν προς το σχηματισμό των νευρομαστών (Εικόνα 2.11B-Δ). Ο πρώιμος σχηματισμός της pLL ολοκληρώνεται στις 48 hpf με την απόθεση των 3 τερματικών νευρομαστών στο ουριαίο άκρο ενώ συνολικά περιλαμβάνει 5-6 νευρομαστούς διευθετημένους ανά τακτά διαστήματα (Εικόνα 2.11E) (Aman and Piotrowski, 2011; Nogare *et al.*, 2017).



**Εικόνα 2.11. Σχηματισμός της οπίσθιας πλευρικής γραμμής.** (Α) Οπίσθια του ωτικού κυστιδίου (OV) εντοπίζεται το γάγγλιο από το οποίο δημιουργείται και ξεκινά να μεταναστεύει προς το ουριαίο άκρο μία ομάδα αρχέγονων κυττάρων (primordium) (Ghysen A. and Dambly-Chaudiere C., 2004). (Β) Το primordium μετακινείται κατά μήκος του οριζόντιου μυοδιαφράγματος και στις 24 hpf βρίσκεται στην περιοχή των πρώτων σωματιών. (Γ) Εναπόθεση του πρώτου προνευρομαστού. (Δ) Απεικόνιση του primordium σε υψηλή μεγέθυνση όπου διακρίνονται οι συστάδες κυττάρων που απαρτίζουν το προπορευόμενο (leading) και το παρακείμενο (trailing) άκρο. (Ε) Η μετανάστευση του primordium σταματά στο άκρο της ουράς κατά μήκος της οποίας έχουν εναποτεθεί ~6 προνευρομαστοί και μεταξύ αυτών μία γραμμή ενδιάμεσων κυττάρων (Aman A. and Piotrowski T., 2011).



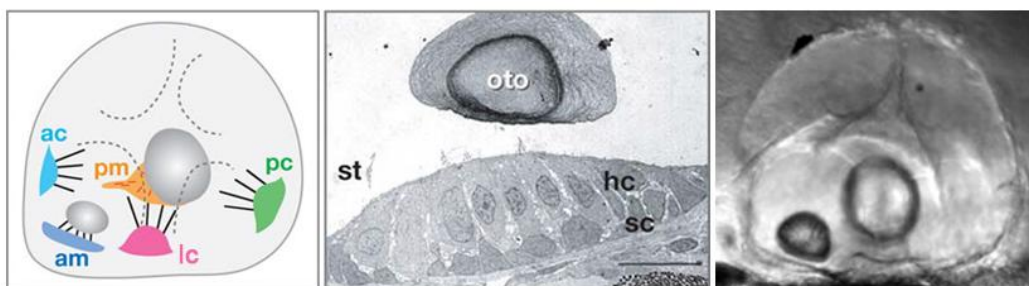
### 2.7.1.3. Ακουστικό-Αιθουσαίο σύστημα

Η ικανότητα του προσανατολισμού στο χώρο είναι καθοριστικής σημασίας τόσο για τους χερσαίους όσο και για τους υδρόβιους οργανισμούς και εξαρτάται άμεσα από την αντίληψη της βαρύτητας και των ερεθισμάτων που προέρχονται από το εγγύς περιβάλλον. Η περιοχή που ευθύνεται για την πρόσληψη αυτών των σημάτων στα θηλαστικά εντοπίζεται στο τμήμα του έσω ωτός γνωστό ως λαβύρινθος ο οποίος διακρίνεται στον κοχλία (ακοή), την αίθουσα και τους ημικυκλικούς σωλήνες (ισορροπία).

Στα σπονδυλωτά το όργανο που αντιστοιχεί στον αιθουσαίο λαβύρινθο καλείται έσω ους και φέρει ανατομικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι δομικά και λειτουργικά συντηρημένα. Το έσω ους αποτελείται από τρία ημικυκλικά κανάλια (semicircular canals) και δύο αισθητήριες κηλίδες (maculae). Στη βάση του καθενός εκ των τριών καναλιών εντοπίζονται αισθητήριες ακρολοφίες οι οποίες διακρίνονται στην εμπρόσθια (anterior crista), την οπίσθια (posterior crista) και την πλευρική ακρολοφία (lateral crista). Οι τρεις ακρολοφίες είναι δομικά όμοιες και αποτελούνται από αισθητήρια κροσσωτά κύτταρα (Εικόνα 2.12). Αντίστοιχα με τα αισθητήρια κύτταρα της πλευρικής γραμμής, στην κορυφαία επιφάνεια των κροσσωτών κυττάρων των ακρολοφιών προεκβάλλουν οι κινητοί κροσσοί περιβαλλόμενοι από μια ζελατινώδη μεμβράνη που εκτείνεται καθ' όλο το μήκος των ημικυκλικών καναλιών. Το σύνολο των ακουστικών δομών περιβάλλονται από ένα υγρό υψηλής σύστασης σε ιόντα  $K^+$  και χαμηλής σε ιόντα  $Na^+$ , την ενδολέμφο. Οποιαδήποτε κίνηση του κεφαλιού προκαλεί αντίστοιχη μετατόπιση της ενδολέμφου. Εντός των ημικυκλικών καναλιών η μετατόπιση αυτή επηρεάζει τη θέση της ζελατινώδους μεμβράνης έχοντας ως συνέπεια την εκτροπή των κινητών κροσσών που οδηγεί τελικά στην υπερπόλωση των υποδεκτικών κυττάρων και την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Μέσω αυτής της διαδικασίας μεταφέρονται στον εγκέφαλο με τη μορφή χημικών σημάτων, πληροφορίες που αφορούν τη θέση του κεφαλιού και τη γωνιακή επιτάχυνση (περιστροφική κίνηση) (Bever and Fekete, 2002; Whitfield, 2002, 2015).

Εκτός των ακρολοφιών, αισθητήρια λειτουργία έχουν και τα όργανα των κηλίδων που διακρίνονται στην κηλίδα του ελλειπτικού κυστιδίου (utricle macula) που εντοπίζεται εμπρόσθια και στην κηλίδα του σφαιρικού κυστιδίου (sacculus macula) η οποία τοποθετείται προς την οπίσθια περιοχή του ωτός (Εικόνα 2.12). Η κάθε ακουστική κηλίδα έχει σχήμα ασκού (παρόμοιο με αυτό του νευρομαστού) και αποτελείται από ένα στρώμα κροσσωτών και στηρικτικών κυττάρων διατεταγμένων έτσι ώστε κάθε κροσσωτό

κύτταρο να διατηρείται απομονωμένο από το παρακείμενο κροσσωτό. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των κηλίδων είναι η παρουσία των ωτόλιθων οι οποίοι προσαρτώνται στην κορυφαία πλευρά των κροσσωτών κυττάρων (Εικόνα 2.12). Οι ωτόλιθοι είναι κρύσταλλοι ανθρακικού ασβεστίου οι οποίοι περικλείονται από μία μεμβράνη, περιβάλλονται από την ενδολέμφο και συμβάλλουν στην αντίληψη της βαρύτητας και της γραμμικής επιτάχυνσης. Στα κατώτερα σπονδυλωτά (ψάρια, αμφίβια) λειτουργούν και ως όργανα ακοής (Bever and Fekete, 2002; Whitfield, 2002, 2015).



**Εικόνα 2.12. Το έσω ους του zebrafish.** Απεικόνιση της τοπολογίας των αισθητήριων ακρολοφιών και κηλίδων. Προσάρτηση ωτόλιθου στους κροσσούς της εμπρόσθιας ακουστικής κηλίδας (ελλειπτικό κυστίδιο), όπου διακρίνονται τα κροσσωτά κύτταρα, τα στηρικτικά κύτταρα και οι στερεοκροσσοί. Κατανομή των δύο ωτόλιθων στο έσω ους (Nicolson, 2005). (ac: εμπρόσθια ακρολοφία, pc: οπίσθια ακρολοφία, lc: πλευρική ακρολοφία, am: εμπρόσθια κηλίδα, pm: οπίσθια κηλίδα, st: στερεοκροσσοί, hc: κροσσωτά κύτταρα, sc: στηρικτικά κύτταρα)

#### 2.7.1.4. Οπτικό σύστημα

Το οπτικό σύστημα είναι ένα εκ των ταχύτερα αναπτυσσόμενων στο zebrafish καθώς αρκετά πρώιμα στην ανάπτυξή τους μετά το στάδιο της εκκόλαψης (48-72 hpf), οι προνύμφες καλούνται μέσω αυτού να εντοπίσουν τη λεία τους και ταυτόχρονα να προστατευθούν από θηρευτές. Επομένως πρόκειται για ένα σύστημα το οποίο λόγω εξελικτικής πίεσης διαμορφώνεται πολύ νωρίς αποκτώντας πλήρως λειτουργικά χαρακτηριστικά. Δομικά απαρτίζεται από τρία κυρίως μέρη: τον οφθαλμό (που περιλαμβάνει τον αμφιβληστροειδή χιτώνα, retina), τους νευράξονες που συνδέουν τον αμφιβληστροειδή με τα κέντρα όρασης και τα κέντρα όρασης του εγκεφάλου που προσλαμβάνουν και επεξεργάζονται την οπτική πληροφορία (Neuhaus, 2010).

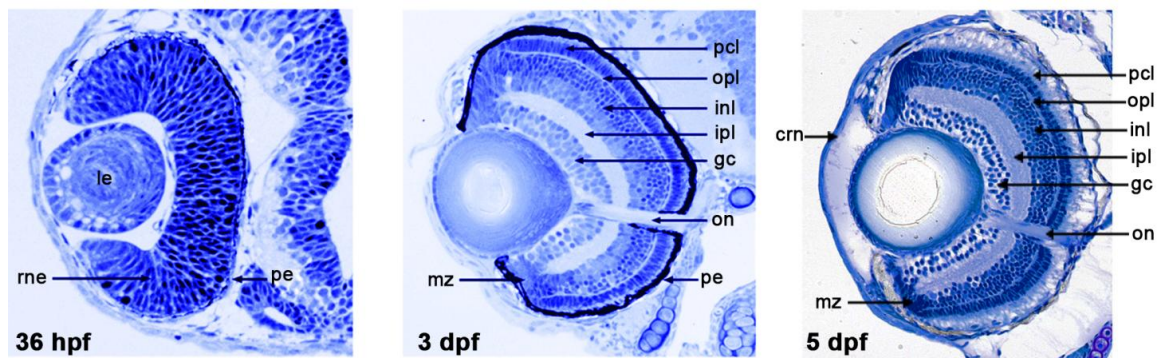
Η μετατροπή του οπτικού σήματος σε νευρικό επιτελείται αποκλειστικά από τον φωτοευαίσθητο χιτώνα του αμφιβληστροειδούς που αποτελεί μέρος του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στο zebrafish όπως και στα υπόλοιπα σπονδυλωτά, ο αμφιβληστροειδής χαρακτηρίζεται από στερεοτυπική οργάνωση έξι τύπων νευρικών κυττάρων και ενός τύπου κυττάρων γλοίας τα οποία είναι διευθετημένα σε τρεις πυρηνικές στιβάδες (nuclear layers) μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται δύο συναπτικές στιβάδες (plexiform layers). Οι διακριτές στιβάδες είναι εμφανείς από την τρίτη ημέρα ανάπτυξης (3 dpf) (Εικόνα 2.13) (Gestri *et al.*, 2012).

Οπίσθια του αμφιβληστροειδή βρίσκεται το **μελάγχρουν επιθήλιο** (retinal pigment epithelium, RPE), το οποίο επενδύει το οπίσθιο τοίχωμα του βολβού και αποτελείται από μία στιβάδα μη νευρικών κυβοειδών κυττάρων. Το RPE δρα ως έξω αιματοαμφιβληστροειδικός φραγμός, συμμετέχει στην ανακύκλωση των εξωτερικών τμημάτων των φωτουποδοχέων καθώς και στο σχηματισμό της ροδοψίνης και των χρωστικών των κωνίων μέσω της αποθήκευσης και απελευθέρωσης της βιταμίνης Α. Στην κορυφαία τους πλευρά τα κύτταρα RPE φέρουν μικρολάχνες οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των φωτουποδοκτικών κυττάρων με τα οποία αλληλεπιδρούν. Επιπλέον περιέχουν τη μαύρη χρωστική μελανίνη που απορροφά το φως που δεν δεσμεύεται από τον αμφιβληστροειδή. Έτσι αποτρέπεται η αντανάκλαση του φωτός στο οπίσθιο τμήμα του βολβού και η διάχυσή του εντός του οφθαλμού που θα οδηγούσε στην αλλοίωση της αρχικής εικόνας (Lister, 2002; Strauss, 2005).

Πρόσθια του μελάγχρουν επιθηλίου εκτείνεται η έξω πυρηνική στιβάδα (outer nuclear layer ONL) του αμφιβληστροειδή που συνιστούν τα κύτταρα των φωτουποδοχέων τα οποία διακρίνονται σε κωνία και ραβδία (Εικόνα 2.13). Στην έσω πυρηνική στιβάδα (inner nuclear layer, INL), εντοπίζονται τα δίπολα κύτταρα (bipolar), τα οριζόντια κύτταρα (horizontal), οι διάμεσοι νευρώνες των βραχύνων ή αμακρίνων κυττάρων (amacrine) και τα σώματα των γλοιακών κυττάρων Müller (Εικόνα 22). Οι νευράξονες των εν λόγω κυττάρων επεκτείνονται και δημιουργούν συνάψεις με τα κύτταρα των φωτουποδοχέων στην έξω συναπτική ή δικτυωτή στιβάδα (outer plexiform layer, OPL) (Εικόνα 2.13).

Εγγύς του φακού βρίσκεται η **στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων** (ganglion cell layer), η οποία αποτελείται από τα γαγγλιακά κύτταρα. Οι μακριοί νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων δημιουργούν το οπτικό νεύρο το οποίο καταλήγει στον οπτικό φλοιό ή τετράδυμο (optic tectum). Οι νευρικές συνάψεις που σχηματίζουν τα γαγγλιακά

κύτταρα με τα κύτταρα της έσω πυρηνικής στιβάδας αποτελούν την έσω συναπτική ή δικτυωτή στιβάδα (inner plexiform layer, IPL) (Εικόνα 2.13) (Gestri *et al.*, 2012). Οι νευρώνες του αμφιβληστροειδή βρίσκονται σε στενή επαφή μεταξύ τους και υποστηρίζονται από ακτινωτά κύτταρα γλοίας, γνωστά ως κύτταρα Müller τα οποία αντιπροσωπεύουν το 4-5% των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς και εκτείνονται καθ' όλο το πάχος του (Hamon *et al.*, 2016).



**Εικόνα 2.13. Η ανατομία του αμφιβληστροειδή στο zebrafish.** Ιστολογική χρώση του αμφιβληστροειδή σε τομές που έχουν ληφθεί από έμβryo (36 hpf) και προνύμφη (3 dpf, 5 dpf ) zebrafish. Στις 36 hpf ο αμφιβληστροειδής αποτελείται από το νευροεπιθήλιο και το μελάγχρουν επιθήλιο. Στις 3 dpf έχουν διαμορφωθεί οι βασικές στιβάδες και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός περιορίζεται πλέον στην ακτινωτή οριακή ζώνη. Στις 5 dpf δεν μεταβάλλεται η αρχιτεκτονική των στιβάδων παρά μόνο αυξάνεται σχετικά το μέγεθος του οφθαλμού και η όραση των προνυμφών είναι πλήρως λειτουργική (Avaneson and Malicki, 2010). (le: φακός, rne: νευροεπιθήλιο αμφιβληστροειδούς, pe: μελάγχρουν επιθήλιο, mz: ακτινωτή ζώνη, pcl: στιβάδα φωτοϋποδοχέων, opl: έξω συναπτική στιβάδα, inl: έσω συναπτική στιβάδα, gc: γαγγλιακό κύτταρο, on: οπτικό νέυρο, crn: κερατοειδής)

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

---

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η SET είναι μια εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη, με ευρύ φάσμα λειτουργιών και σχεδόν καθολική έκφραση στο σύνολο των κυτταρικών τύπων και ιστών. Η σημαντική αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης έχει συνδεθεί με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων. Ως αναστολέας της φωσφατάσης PP2A, η SET εμπλέκεται στην ανάπτυξη της νόσου Alzheimer. Ωστόσο χαρακτηριστικότερη είναι η δράση της ως ογκοπρωτεΐνη στην εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκίνου, γεγονός που έχει πυροδοτήσει τη διεξαγωγή ερευνών για την αξιοποίηση της SET ως πιθανό στόχο ανάπτυξης φαρμάκων.

Παρότι η SET έχει μελετηθεί εκτενώς σε πλήθος κυτταρικών συστημάτων, οι μοριακοί μηχανισμοί ή/και τα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων ασκεί τη δράση της παραμένουν άγνωστοι μέχρι και σήμερα. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί για πρώτη φορά σε επίπεδο οργανισμού, ο φυσιολογικός ρόλος της εν λόγω πρωτεΐνης, αξιοποιώντας τα πλεονεκτήματα που προσφέρει το πειραματικό μοντέλο *Danio rerio* (zebrafish), εστιάζοντας τη μελέτη στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης.

Οι ειδικότεροι στόχοι της διατριβής ήταν :

- α. η μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb* κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του zebrafish,
- β. η μελέτη του εντοπισμού των πρωτεϊνών Seta και Setb κατά την εμβρυϊκή και προνυμφική ανάπτυξη,
- γ. η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb* (knock down) και η μορφολογική/ μοριακή ανάλυση των εμβρύων, και
- δ. η ανάλυση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης εμβρύων zebrafish μετά από την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb*.



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 3.1. Εξοπλισμός και αναλώσιμα

#### 3.1.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός

- › Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης Leica TCS-SP5, Leica Microsystems. Διαθέτει πηγή εκπομπής ακτινοβολίας laser Argon (488nm) / DPSS (561nm)/ HeNe (633nm) και λογισμικό Leica TCS.
- › Σύστημα Στερεοσκοπίου φθορισμού Zeiss SteREO Discovery V12 εξοπλισμένο με κάμερα για λήψη φωτογραφιών και λογισμικό ZEN 2 lite.
- › Σύστημα εκτροφής zebrafish ZebTEC, Aquatics Zebrafish Housing System, Techniplast, Ιταλία
- › Συσκευή κατασκευής βελονών για μικροενέσεις Flaming-Brown Micropipette Puller, Model P-97 Sutter Instrument Co. Ρυθμίσεις: Heat 600, Pull 50, Velocity 150, Time 200.  
Για την κατασκευή των βελονών χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τριχοειδή τύπου 1B120-4 (μήκος 100 mm, O.D 1.2 mm, I.D 0.68 mm), World Precision Instruments
- › Σύστημα μικροενέσεων Microprocessor-controlled Injector Nanoliter 2000, World Precision Instruments
- › Θερμικός κυκλοποιητής (PCR) GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems
- › Θερμικός κυκλοποιητής πραγματικού χρόνου (qPCR) με σύστημα τριχοειδών LightCycler 2.0, Roche
- › Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA Kisker Biotech GmbH
- › Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών Biorad
- › Συσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς Biorad
- › Σύστημα φωτογράφισης και ψηφιακής απεικόνισης πηγμάτων με ενσωματωμένη φωτογραφική κάμερα Canon
- › UV Transilluminator
- › Φωτόμετρο Ultraspec-2001, Biochrom
- › Φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific
- › Σύστημα ποιοτικής ανάλυσης RNA Bioanalyzer 2100, Agilent Genomics

- > Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5415 D
- > Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος Heraeus Megafuge 1.0R
- > Κλίβανος υβριδισμού
- > Υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 28.5 °C TW20, Julabo
- > Μετρητής pH, HI2210-01 Hanna Instruments

### **3.1.2. Χημικά αναλώσιμα και Διαλύματα**

#### PBS 10x, pH 7.4

80 g NaCl, 2 g of KCl, 14.4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> διαλύονται σε 1 L of ddH<sub>2</sub>O. Το pH του 1x PBS πρέπει να είναι 7.4.

#### PBS 10x, pH 5.5

80 g NaCl, 2 g of KCl, 10.8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 65 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> διαλύονται σε 1 L of ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρου 0.22 μm. Το pH του 1x PBS πρέπει να είναι 5.5.

#### PBSTw 0.1% (ή PBT)

1x PBS pH 7.4, 0.1% Tween 20

#### PBSTr 0.1%

1x PBS pH 7.4, 0.1% Triton X-100

#### Διάλυμα εμβρύων E3, 60x (1 L)

5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>. Ρύθμιση pH με NaOH στο 7.2. Αποθήκευση στους 4°C.

#### Methylcellulose 2%

Σε 100ml ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 2 g methylcellulose υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C για ~4 ημέρες. Αποθήκευση στους 4°C.

#### PPD (p-Phenylenediamine) anti-fade

Σε 5 ml PBS 10x διαλύονται 50 mg PPD (Sigma, P6001), στους 4 °C υπό συνεχή ανάδευση (end over end). Άμεσα αφού διαλυτοποιηθεί προστίθεται 87% γλυκερόλη ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50 ml. Η διαδικασία ολοκληρώνεται προτού το διάλυμα αρχίσει



να αποκτά κιτρινωπή απόχρωση. Μεταφορά σε aliquots (1ml) και αποθήκευση στους -80 °C.

#### PTU 3% (1-Phenyl-2-thiourea)

Σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 3 g PTU (Sigma, P7629). Χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 0.003% μετά από αραίωση σε διάλυμα εμβρύων E3 1x. Αποθήκευση στους 4°C.

#### Methylene Blue 0.03M

Σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O διαλύεται 1 g Methylene Blue (MW 319.86). Από το πυκνό διάλυμα προσθέτουμε 200 μl σε 1 L διαλύματος εμβρύων E3 1x.

#### Tricaine 25x (3-amino benzoic acidethylester, MS222)

Σε 97.9 ml ddH<sub>2</sub>O προστίθενται 400 mg tricaine και 2.1 ml 1 M Tris pH 9.0. Ρύθμιση pH ~7.0.

#### EDTA 0.5 M, pH 8

Σε 400ml ddH<sub>2</sub>O προστίθενται 93.05 g Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O και 9g NaOH. Μόλις διαλυθεί το NaOH, προστίθεται στάγδην διάλυμα NaOH 10N. Το EDTA διαλύεται πλήρως μόλις το pH γίνει 8.0. Συμπλήρωση του όγκου στα 500 ml με ddH<sub>2</sub>O.

#### Διάλυμα λύσης RIPA

50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate Αποθήκευση στους 4°C.

#### Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 4x Laemmli

250 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 40% (v/v) γλυκερόλη, 0.005% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης. Προσθήκη 100 mM DTT.

#### Διάλυμα επιστοίβαξης (Stacking Buffer), pH 6.8

Tris 0.5M. Ρύθμιση pH με πυκνό HCl.

#### Διάλυμα διαχωρισμού (Separating Buffer), pH 8.8

Tris 1.5M. Ρύθμιση pH με πυκνό HCl

#### Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Electrode 10x)

Σε 1 L ddH<sub>2</sub>O προστίθενται 30 g Tris, 144 g γλυκίνη και 10 g SDS. pH 8.3.

#### Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer)

100 ml Electrode 10x, 200 ml μεθανόλη και 700 ml ddH<sub>2</sub>O

#### Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA (TAE 50x)

Σε 1 L ddH<sub>2</sub>O προστίθενται 242 g Tris, 100 ml EDTA 0.5M και 57.1 ml Acetic acid

#### Πλήρες θρεπτικό υλικό LB (Luria Broth)

Σε 1 L ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 10 g NaCl, 10 g Πεπτόνη και 5 g εκχύλισμα ζύμης.  
Αποστείρωση

#### Πλήρες θρεπτικό υλικό LB (Luria Broth) και άγαρ

Σε 1 L ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 10 g NaCl, 10 g Πεπτόνη, 5 g εκχύλισμα ζύμης και 15 g άγαρ.  
Αποστείρωση

#### SSC 20x (Standard Sodium Citrate)

175.3 g NaCl και 88.2 g Citric acid trisodium salt διαλύονται σε 1 L ddH<sub>2</sub>O

#### Alkaline Tris Buffer

100mM Tris HCl pH 9.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl, 0.1% Tween-20.

#### DEPC-ddH<sub>2</sub>O

Το Diethyl pyrocarbonate (DEPC) είναι ένας αποτελεσματικός, μη ειδικός αναστολέας των ριβονουκλεασών. Η χρήση του είναι απαραίτητη για την παρασκευή διαλυμάτων ή νερού πλήρως απαλλαγμένων από RNases, που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια πειραματικών διαδικασιών που εμπεριέχουν RNA. Σε 1 L ddH<sub>2</sub>O προστίθεται DEPC σε τελική συγκέντρωση 0.1 % (v/v), ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση, ολονύκτια επώαση στους 37 °C και αποστείρωση για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DEPC.

#### Διάλυμα υβριδισμού HM (Hybridization mix)

100 ml deionized formamide, 50 ml 20x SSC, 1ml 20% Tween-20, 460 μl 1M citric acid και 28.54 ml ddH<sub>2</sub>O. Διαχωρισμός της ποσότητας σε φυγοκεντρικά σωληνάρια των 50 ml (4x45ml).

Παρασκευή HM- : προσθήκη 5 ml ddH<sub>2</sub>O σε 45 ml HM. Αποθήκευση στους -20 °C

Παρασκευή HM+: προσθήκη 500 μg/ml tRNAs και 50 μg/ml heparin σε 45 ml HM.

Ρύθμιση του όγκου στα 50 ml και αποθήκευση στους -20 °C.

#### Διάλυμα εκχύλισης γενωμικού DNA

10 mM Tris pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.2% Triton-X100, 0.2 mg/ml Proteinase K (προστίθεται πριν τη χρήση).

### 3.1.3. Αντισώματα

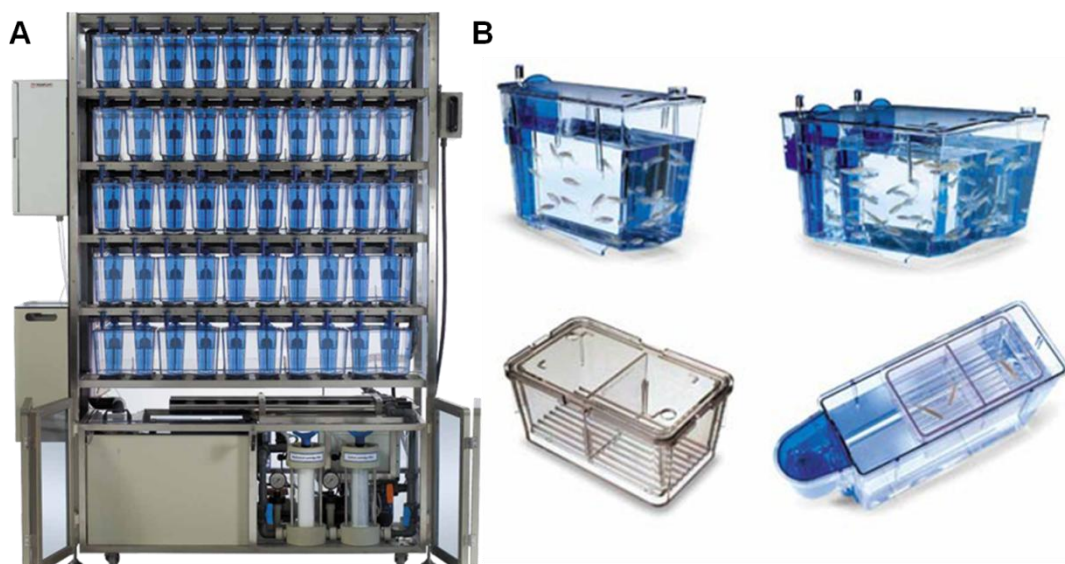
	Αντίσωμα	Ισότυπος (IgG)	Εταιρία	Ανοσοφθορισμός	Ανοσοαποτύπωση Western
Πρωτογενή	I2PP2A	αιγός (πολυκλωνικό)	(E-15) sc-5655, Santa Cruz Biotechnology		1:1000
	Setb ή DR-SET	κονίκλου (πολυκλωνικό)	Davids Biotechnologie GmbH (MSASA AKVSRKE QNSNHDGADET)	1:40	1:1000
	cleaved caspase-3	κονίκλου (μονοκλωνικό)	(Asp175) ( 5A1E) Cell Signaling Technology , 9664L	1:100	
	Acetylated tubulin	ποντικού (μονοκλωνικό)	(6-11B-1) Sigma-Aldrich, T7451	1:500	1:8000
	α- tubulin	ποντικού (μονοκλωνικό)	(B-5-1-2) Sigma-Aldrich, T5168		1:5000
Δευτερογενή	Alexa Fluor 488	κονίκλου / ποντικού	Jackson	1:400	
	Alexa Fluor 594	κονίκλου / ποντικού	Jackson	1:400	
	συζευγμένο με HRP	αιγός/ κονίκλου	Sigma-Aldrich		1:3000
	συζευγμένο με HRP	ποντικού	Sigma-Aldrich		1:5000

## **3.2. Μέθοδοι και τεχνικές**

### **3.2.1. Σύσταση και διατήρηση των πειραματικών πληθυσμών zebrafish**

Ο πληθυσμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν για το σύνολο των πειραμάτων, προήλθαν από απόθεμα γεννητόρων αγρίου τύπου. Η διατήρηση και ανάπτυξη του πληθυσμού έγινε σε αυτοματοποιημένο σύστημα εκτροφής zebrafish, ZebTEC. Η θερμοκρασία του συστήματος διατηρείται στους 28.5 °C ±1, η φωτοπερίοδος χαρακτηρίζεται από 14 ώρες φώς/ 10 ώρες σκοτάδι, οι τιμές του pH κυμαίνονται μεταξύ 7-7,5 και της αγωγιμότητας μεταξύ 500-530 μS. Πρόκειται για ένα κλειστό κύκλωμα ανανέωσης νερού το οποίο τροφοδοτείται από την κεντρική παροχή και καθαρίζεται μέσω ενός συστήματος φίλτρων αντίστροφης όσμωσης. Η ποιότητα του νερού διασφαλίζεται και εντός του συστήματος μέσω τριών επιπλέον φίλτρων (μηχανικό, βιολογικό και ενεργού άνθρακα) σε συνδυασμό με την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία από δύο λάμπες UV οι οποίες εξασφαλίζουν την απολύμανση του ανακυκλούμενου νερού προτού αυτό εισέλθει εκ νέου στην κυκλοφορία (Εικόνα 3.1A).

Η διαδικασία των αναπαραγωγών ξεκινά την προηγούμενη ημέρα της συλλογής των εμβρύων με την τοποθέτηση των θηλυκών και αρσενικών ατόμων σε ειδικές κατασκευές όπου παραμένουν σε ξεχωριστούς θαλάμους ολονύκτια, με τη χρήση πλαστικού διαχωριστικού φίλτρου. Το επόμενο πρωί αφαιρείται το φίλτρο και ακολουθεί η ωοτοκία (Εικόνα 3.1B). Τα έμβρυα στη συνέχεια συλλέγονται και τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 28.5 °C με δυνατότητα διέλευσης φωτός, εντός ρυθμιστικού διαλύματος εμβρύων E3. Η τροφή που λαμβάνουν τα ψάρια είναι τυποποιημένη (Zebrafish 02.03, Zebrafish 05.08 - Dieta Standard) και κατάλληλη ώστε να καλύπτει τις διατροφικές απαιτήσεις τόσο των ενήλικων ατόμων όσο και των λαρβών, ενώ η συχνότητα ταΐσματος δεν ξεπερνά τις δύο φορές την ημέρα.



**Εικόνα 3.1.** (A) Αυτοματοποιημένο σύστημα εκτροφής πληθυσμού zebrafish. (B) Αναπαραγωγή zebrafish. Επιλογή αρσενικών και θηλυκών γεννητόρων από ξεχωριστές δεξαμενές και μεταφορά τους σε ειδική κατασκευή αναπαραγωγής με κάθετο διαχωριστικό φίλτρο.

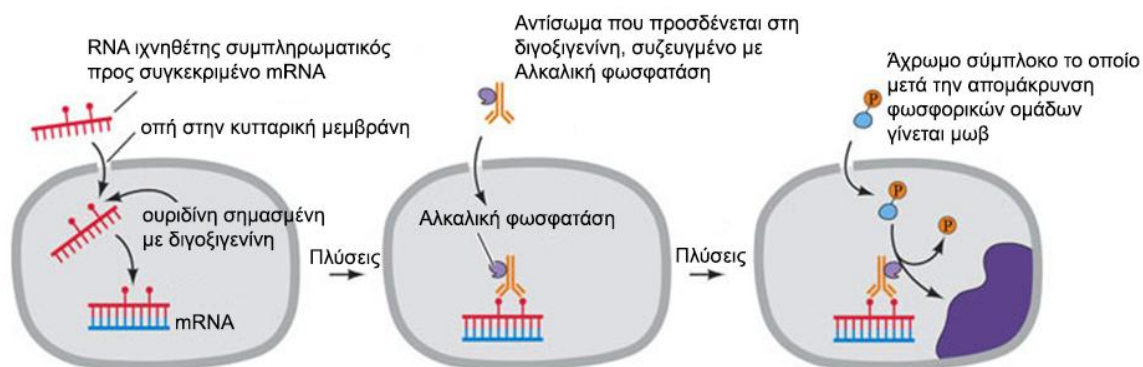
### 3.2.2. Συλλογή και μονιμοποίηση zebrafish

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια όπως 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf, 4 dpf, 5 dpf και 7 dpf σύμφωνα με την επικείμενη πειραματική διαδικασία. Απαραίτητο βήμα πριν τη μονιμοποίηση στην περίπτωση των εμβρύων ( $\leq 48$  hpf) ήταν η αφαίρεση των προστατευτικών χορίων με βελόνες. Επίσης προκειμένου τα έμβρυα να παραμείνουν διάφανα μέχρι το στάδιο της μονιμοποίησης, τοποθετούνταν σε διάλυμα εμβρύων E3 1x ενισχυμένο με PTU 0.003%, το οποίο ανανεωνόταν καθημερινά. Η PTU παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μελανοφόρων κυττάρων, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την βέλτιστη παρατήρηση των αναπτυσσόμενων δομών και οργάνων. Η διαδικασία μονιμοποίησης ξεκινούσε με δύο πλύσεις (x5 λεπτά) των εμβρύων σε PBS 1x, μία πλύση (5 λεπτά) σε PFA 4% και επώαση σε PFA 4% είτε για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (RT) είτε στους 4 °C ολονύκτια (O/N). Ακολούθησαν δύο πλύσεις (x5 λεπτά) σε PBS 1x και σταδιακή αφυδάτωση με επώαση των εμβρύων σε 75% PBS-25% MeOH, 50% PBS-50% MeOH, 25% PBS-75% MeOH και 100% MeOH διάρκειας 10 λεπτά η καθεμία. Η αφυδάτωση με μεθανόλη επιτρέπει την αποθήκευση των εμβρύων στους -20 °C για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (1-12 μήνες), χωρίς να διακυβεύεται η ακεραιότητα των δειγμάτων.

### 3.2.3. *In situ* υβριδισμός σε έμβρυα zebrafish (whole mount)

Ο *in situ* υβριδισμός αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για την ανίχνευση των περιοχών έκφρασης ενός γονιδίου. Συγκεκριμένα, καθιστά εφικτή τη μελέτη του προτύπου έκφρασης και δράσης ενός γονιδίου χωρικά και χρονικά. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην σύνθεση ενός μονόκλωνου RNA ιχνηθέτη (probe) συμπληρωματικού προς συγκεκριμένη αλληλουχία DNA ή mRNA. Κατά την *in vitro* σύνθεση του ιχνηθέτη, στην αλληλουχία ενσωματώνονται νουκλεοτίδια ουριδίνης συζευγμένα με διγοξιγενίνη και το σημασμένο πλέον RNA αφού εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου υβριδίζει με τη συμπληρωματική αλυσίδα του mRNA-στόχου με το οποίο σχηματίζει ένα σταθερό διμερές μόριο. Ο προσδιορισμός των θέσεων έκφρασης του mRNA καθίσταται εφικτός με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει τη διγοξιγενίνη ενώ είναι συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Παρουσία κατάλληλου χρωμογόνου υποστρώματος η αλκαλική φωσφατάση καταλύει την αποφωσφορυλίωσή του. Αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός ενός προϊόντος ιώδους/μωβ χρώματος το οποίο καθιζάνει σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου ή ιστού που υποδεικνύει η παρουσία του mRNA-στόχου διευκολύνοντας έτσι τον εντοπισμό των περιοχών αυτών (Εικόνα 3.2).

Ως τεχνική ανοσοϊστοχημείας ο *in situ* υβριδισμός παρουσιάζει ευρεία εφαρμογή σε κύτταρα, τομές ιστών, ολόκληρους ιστούς ακόμη και έμβρυα (whole mount). Στο zebrafish χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Έκτοτε η διαδικασία έχει βελτιωθεί σημαντικά, συμβάλλοντας στην ανάλυση του προτύπου έκφρασης πλήθους γονιδίων.



Εικόνα 3.2. Σχηματική περιγραφή των βασικών βημάτων του *in situ* υβριδισμού.

### 3.2.3.1. Σχεδιασμός και σύνθεση των RNA ιχνηθετών

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών των ιχνηθετών έγινε με βάση τα μετάγραφα των γονιδίων *seta* (NM\_201475) και *setb* (NM\_201468), εστιάζοντας στις 3' αμετάφραστες περιοχές (3'UTR). Η ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων DNA έγινε με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών όπως αναγράφονται παρακάτω.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Μέγεθος προϊόντος
<i>seta</i> 3UTR-F	TCCCCAGTCCTGTTTCCA	485 bp
<i>seta</i> 3UTR-R	GGTTTAATCAGCTGATAGAC	
<i>setb</i> 3UTR-F	GAAGTCATCCTCCAACCAC	442 bp
<i>setb</i> 3UTR-R	CCCAAAGAGTTGACTGT	

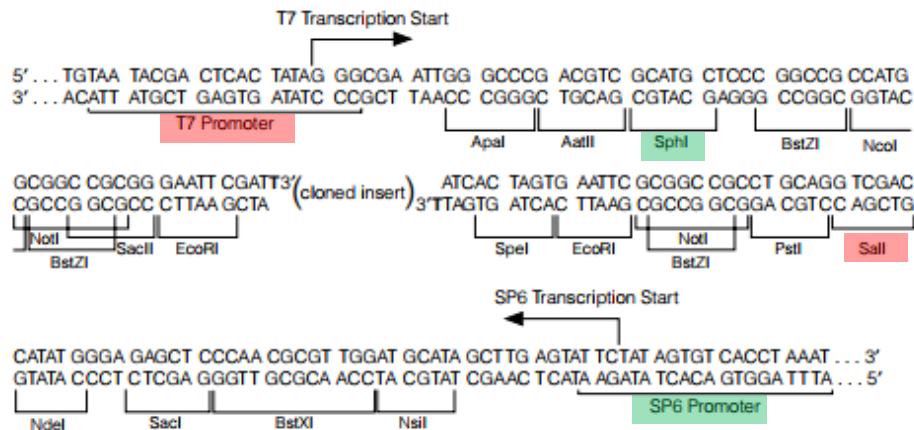
Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε από την προσθήκη 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x, 0.5 μl MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μl dNTPs, 1.25 μl από τον κάθε εκκινητή, 0.5 μl cDNA που είχε απομονωθεί από έμβρυα zebrafish, 0.5 μl KAPA HiFi Πολυμεράσης και 15.5 μl αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O (τελικός όγκος 25 μl) (KAPA HiFi PCR Kit, KAPA Biosystems).

Οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Αρχική αποδιάταξη	95 °C , 2 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95 °C , 20 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	67 °C , 30 sec	25 κύκλοι
Επιμήκυνση	72 °C , 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72 °C , 5 min	1 κύκλος

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (1%) από την οποία διαχωρίστηκαν οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στο αναμενόμενο μοριακό μέγεθος. Ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός του DNA από την πηκτή με τη χρήση του PCR Clean-up Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για τη σύνθεση των ιχνηθετών τα τμήματα DNA κλωνοποιήθηκαν αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega). Ο συγκεκριμένος φορέας έχει καταστεί γραμμικός μετά από πέψη με EcoRV και στα ελεύθερα 3' άκρα του έχουν προστεθεί κατάλοιπα T. Επιπλέον η ύπαρξη δύο περιοχών υποκινητών καθιστά δυνατή τη σύνθεση τόσο της νοηματικής αλυσίδας RNA (T7 RNA πολυμεράση) όσο και της αντινοηματικής (SP6 RNA πολυμεράση) (Εικόνα 3.3).



**Εικόνα 3.3.** Οι περιοχές των υποκινητών και του πολυσυνδέτη στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega).

Η διαδικασία κλωνοποίησης που ακολουθήθηκε διαφέρει από τη συμβατική καθώς δεν απαιτεί τη χρήση περιοριστικών ενζύμων, αντίθετα στηρίζεται στη συμπληρωματικότητα των ελεύθερων 3'-T του φορέα και 5'-A της ένθεσης (TA cloning). Η προσθήκη των καταλοίπων A στα τμήματα DNA προς κλωνοποίηση έγινε με τη χρήση της Taq πολυμεράσης.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε έπειτα από την προσθήκη 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x, 3 μl MgCl<sub>2</sub>, 1 μl dATP, 28 μl καθαρού προϊόντος PCR, 0.2 μl GoTaq Πολυμεράσης και 7.8 μl αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O (τελικός όγκος 50 μl) (GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase Kit της Promega και dATP της Amersham). Η επώαση της αντίδρασης έγινε στους 72 °C για 22 λεπτά. Ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός του DNA μέσω στήλης με τη χρήση του PCR Clean-up Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel).

Ο ανασυνδυασμός των πλασμιδιακών φορέων έγινε μέσω αντίδρασης δεσμοποίησης (ολονύκτια επώαση στους 16 °C), μετασχηματισμού σε επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* (DH10b) και επίστρωσης αυτών σε τρυβλία άγαρ παρουσία αμπικιλίνης. Στη συνέχεια αφού έγινε έλεγχος επιλεγμένων αποικιών για την ύπαρξη του ανασυνδυασμένου



πλασμιδίου, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με τη χρήση του NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας. Οι χάρτες των πλασμιδιακών κατασκευών pGEMT-seta3UTR και pGEMT-setb3UTR, όπως και οι αλληλουχίες των ενθέσεων παρατίθενται στο Παράρτημα 1. Ο προσανατολισμός των ενθέσεων ελέγχθηκε με πέψη των πλασμιδιακών κατασκευών με το περιοριστικό ένζυμο NcoI.

Η σύνθεση των RNA ιχνηθετών έγινε μετά από πέψη και γραμμικοποίηση των πλασμιδιακών κατασκευών με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Συγκεκριμένα για τη σύνθεση του νοηματικού ιχνηθέτη χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SalI ενώ για τον αντινοηματικό το SphI. Η αντίδραση της *in vitro* μεταγραφής έγινε με την χρήση του DIG RNA Labeling Kit (Roche Applied Biosystems), χρησιμοποιώντας την T7 RNA Πολυμεράση για τη σύνθεση του νοηματικού RNA ιχνηθέτη και την Sp6 RNA Πολυμεράση για την σύνθεση του αντινοηματικού.

### 3.2.3.2. Πρωτόκολλο *in situ* υβριδισμού

Για την ανίχνευση των περιοχών έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb* συλλέχθηκαν δείγματα εμβρύων και προνυμφών zebrafish στα στάδια των 24 hpf, 48 hpf και 5 dpf. Προκειμένου να παρεμποδιστεί η διαδικασία μελάγχρωσης μετά το πέρας των 22 hpf τα έμβρυα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα E3 το οποίο περιείχε 0.003% PTU, όπου και παρέμειναν έως ότου φτάσουν το επιθυμητό στάδιο. Ακολούθως τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν με ολονύκτια επώαση σε PFA 4%, στους 4 °C και διαδοχική αφυδάτωση μέσω πλύσεων με 25%, 50%, 75% MeOH/PBS (pH 7.4) και 100% MeOH, διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούν πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με δημοσιευμένο πρωτόκολλο (Thisse and Thisse, 2008).

#### ‡ Ενυδάτωση δειγμάτων

Η επαναφορά των δειγμάτων από την αφυδατωμένη κατάσταση έγινε σταδιακά με διαδοχικές πλύσεις σε 75%, 50%, 25% MeOH/PBS (pH 7.4) και τέσσερις πλύσεις σε PBSTw 0.1% (PBT), των 5 λεπτών η καθεμία, σε θερμοκρασία δωματίου.

### ‡ Αύξηση διαπερατότητας

Καθοριστικό βήμα για την εξασφάλιση της πρόσβασης των RNA ιχνηθετών στο εσωτερικό των κυττάρων και τον επακόλουθο υβριδισμό τους με τα μετάγραφα-στόχους είναι η δημιουργία οπών στην κυτταρική μεμβράνη η οποία αποτελεί βασικό φραγμό. Στην προκειμένη περίπτωση αυτό εξασφαλίζεται μέσω της δράσης της Πρωτεΐνης K. Η επώαση των δειγμάτων σε διάλυμα ενζύμου αραιωμένο σε PBT, διαμορφώθηκε με βάση το αναπτυξιακό στάδιο ως εξής:

Στάδιο	Συγκέντρωση Prot K	Χρόνος επώασης
24 hpf	10 µg/µl	8 λεπτά
48 hpf	10 µg/µl	20 λεπτά
5 dpf	10 µg/µl	45 λεπτά
	3 µg/µl	25 λεπτά

Στην περίπτωση των προνυμφών 5 dpf χρησιμοποιήθηκε μία δεύτερη συνθήκη με επώαση των δειγμάτων σε μικρότερη συγκέντρωση ενζύμου για λιγότερο χρόνο, ώστε να διασφαλιστεί η ακεραιότητα των νευρομαστών καθώς αποτελούν επιφανειακές δομές και ταυτόχρονα να καταστεί δυνατή η χρώση τους. Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν εκ νέου σε PFA 4%, για 20 λεπτά. Η απομάκρυνση της PFA έγινε με 5 πλύσεις σε PBT των 5 λεπτών.

### ‡ Υβριδισμός

Εν συνεχεία, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε προθερμασμένο διάλυμα υβριδισμού HM+ όπου και επώαστηκαν για 3 ώρες στους 70 °C, εντός κλιβάνου υβριδισμού. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση σε διάλυμα HM+ παρουσία των νοηματικών και αντινοηματικών RNA ιχνηθετών σε κατάλληλες αραιώσεις, υπό τις ίδιες συνθήκες.

### ‡ Πλύσεις

Επόμενο βήμα ήταν η πλήρης απομάκρυνση των μη-υβριδισμένων ιχνηθετών με διαδοχικές πλύσεις σε προθερμασμένα διαλύματα 75% HM-/25% SSC 2x, 50% HM-/50% SSC 2x, 25% HM-/75% SSC 2x και SSC 2x για 10 λεπτά ακολουθούμενες από ακόμη δύο πλύσεις των 30 λεπτών σε SSC 0.2x. Το σύνολο των πλύσεων έγινε στους 70 °C, σε κλίβανο υβριδισμού. Ακολούθως τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου όπου πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πλύσεις σε 75% SSC 0.2x/25% PBT, 50% SSC

0.2x/50% PBT, 25% SSC 0.2x/75% PBT και PBT των 10 λεπτών η καθεμία, υπό ανακίνηση.

#### ‡ Αποκλεισμός μη ειδικών θέσεων

Τα δείγματα επώαστηκαν στη συνέχεια σε διάλυμα αποκλεισμού που περιείχε το αντιδραστήριο αποκλεισμού (Roche) αραιωμένο σε PBT, για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

#### ‡ Αντίσωμα

Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 4 °C με το anti-DIG αντίσωμα αραιωμένο 1:5000 σε διάλυμα αποκλεισμού, υπό ανακίνηση. Σε αυτό το στάδιο το αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, προσδένεται στα μόρια διγοξιγενίνης με τα οποία έχουν σημανθεί τα νουκλεοτίδια ουριδίνης των RNA ιχνηθετών.

#### ‡ Πλύσεις

Η απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντισώματος έγινε με 6 πλύσεις των 15 λεπτών σε PBT και ακόμη 3 πλύσεις των 5 λεπτών σε αλκαλικό διάλυμα (Alkaline Tris).

#### ‡ Χρώση

Η ανάπτυξη του χρωμογόνου έγινε με τοποθέτηση των δειγμάτων σε διάλυμα χρώσης το οποίο περιείχε το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium) αραιωμένο σε διάλυμα Alkaline Tris, υπό σκοτεινές συνθήκες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελεγχόταν ανά 5-10 λεπτά με παρατήρηση του βαθμού χρώσης των δειγμάτων, σε στερεοσκόπιο. Η ταχύτητα ανάπτυξης χρώματος καθώς και η ένταση αυτού σε μία περιοχή, είναι άμεσα εξαρτώμενη των επιπέδων έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου στην αντίστοιχη θέση καθώς και του σταδίου ανάπτυξης.

#### ‡ Διακοπή της αντίδρασης

Η εξέλιξη της αντίδρασης διεκόπη με 2 πλύσεις των 5 λεπτών σε 1x PBS pH 5.5/ 1mM EDTA. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών σε 25%, 50% και 75% MeOH/ 1x PBS pH5.5-1mM EDTA, 2 πλύσεις των 20 λεπτών σε 100% MeOH, ακόμη 3 πλύσεις των 5 λεπτών σε 75%, 50% και 25% MeOH/ 1x PBS pH5.5-1mM EDTA και μία σε 1x PBS pH 5.5.

Τέλος, τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε 90% γλυκερόλη σε PBS pH 5.5 όπου και παρέμειναν για τουλάχιστον 16 ώρες στους 4 °C. Την επόμενη ημέρα τοποθετήθηκαν σε

καλυπτρίδες και παρατηρήθηκαν με τη χρήση στερεοσκοπίου Nikon SMZ800 και μικροσκοπίου Olympus BX41.

#### **3.2.4. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε έμβρυα και προνύμφες zebrafish (whole mount)**

Αρχικά πραγματοποιήθηκε συλλογή και μονιμοποίηση των εμβρύων στο επιθυμητό κάθε φορά στάδιο. Για την ανίχνευση της Seta/b, τα έμβρυα μονιμοποιήθηκαν σε 4% PFA ολονύκτια στους 4 °C. Ακολούθησαν 2 πλύσεις των 5 λεπτών σε PBS, μία πλύση σε PBSTr 0.1% για 10 λεπτά, επώαση σε διάλυμα αποκλεισμού των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων (10% FCS, 0.1% Triton) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επακόλουθη επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα αποκλεισμού, ολονύκτια στους 4 °C. Η απομάκρυνση της περίσσειας πρωτογενούς αντισώματος έγινε με 6 πλύσεις σε PBS των 10 λεπτών και τα δείγματα επώαστηκαν σε διάλυμα αποκλεισμού παρουσία δευτερογενούς αντισώματος για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκοτεινές συνθήκες. Ακολούθησαν 6 ακόμη πλύσεις σε PBS 1x των 10 λεπτών και τοποθέτηση των δειγμάτων σε σε αντικειμενοφόρους πλάκες όπου καλύφθηκαν με ειδικό διάλυμα anti-fade PPD ή methylcellulose.

Στην περίπτωση της μελέτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού έγινε χρώση των εμβρύων με το αντίσωμα anti-phospho Histone H3. Τα δείγματα αρχικά μονιμοποιήθηκαν σε 4% PFA για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη μονιμοποίηση έγιναν 2 πλύσεις των 5 λεπτών σε PBS 1x και τα έμβρυα αφυδατώθηκαν με ολονύκτια επώαση σε 100% μεθανόλη στους -20 °C. Επόμενο βήμα ήταν η αφαίρεση της μεθανόλης και η τοποθέτηση των εμβρύων σε ψυχρή 100% ακετόνη για 7 λεπτά στους -20 °C ώστε να καταστούν οι μεμβράνες των κυττάρων διαπερατές. Ακολούθησε σταδιακή ενυδάτωση των δειγμάτων με επώαση σε 50% MeOH-50% PBS για 1 ώρα στους -20 °C, μία πλύση σε διασπασταγμένο νερό και δύο ακόμη σε PBSTw 0.1% , των 5 λεπτών η καθεμία. Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν σε διάλυμα αποκλεισμού FCS-DT (10% FCS, 1% DMSO, 0.1% Tween-20) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και επακόλουθη ολονύκτια επώαση στους 4 °C με το πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα αποκλεισμού. Η απομάκρυνση του αντισώματος έγινε με 4 πλύσεις των 15 λεπτών σε PBS-DT (PBS, 1 % DMSO, 0.1% Tween-20) και τα δείγματα επώαστηκαν σε κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός. Επαναλήφθηκαν 4

πλύσεις των 15 λεπτών σε PBS-DT και ακολούθησε χρώση των πυρήνων με επώαση των εμβρύων στην χρωστική TOPRO-3 (1:2000 σε PBS) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες σκότους. Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Η ανάλυση των επιπέδων απόπτωσης έγινε με τη χρήση του αντισώματος που αναγνωρίζει την ενεργή κασπάση-3 (anti- active caspase-3). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αντίστοιχη της προαναφερθείσας για την ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης Ιστόνης H3.

Η σήμανση του νευρικού συστήματος των εμβρύων έγινε με τη χρήση του αντισώματος της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης. Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε 4% PFA και έπειτα σε 100% MeOH. Στη συνέχεια επώαστηκαν σε ψυχρή 100% ακετόνη για 7 λεπτά στους -20 °C και ενυδατώθηκαν με διαδοχικές πλύσεις σε 95, 75, 50 και 25% MeOH-PBS, διάρκειας 10 λεπτών η καθεμία στους -20 °C. Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών σε PBSTr 0.5%. Η αύξηση της προσβασιμότητας του αντισώματος εντός των κυττάρων εξασφαλίστηκε μέσω πέψης με 10 μg/ml Πρωτεΐνάσης K σε PBSTw για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η απομάκρυνση του ενζύμου συνοδεύτηκε από δύο σύντομες πλύσεις σε PBSTr 0.5%, εκ νέου μονιμοποίηση σε PFA 4% για 30 λεπτά και πλύσεις σε PBSTr 0.5% (3x5 λεπτά). Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν σε διάλυμα αποκλεισμού (10% FCS, PBS και 0.5% Triton-X100) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στο πρωτογενές αντίσωμα ολονύκτια στους 4 °C. Τη σήμανση των δειγμάτων με το πρωτογενές αντίσωμα, διαδέχτηκαν 4 πλύσεις των 15 λεπτών σε PBSTr 0.5%, επώαση σε κατάλληλο δευτερογενές αραιωμένο σε διάλυμα αποκλεισμού για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, υπό σκότος και 4 ακόμη πλύσεις σε PBSTr 0.5%. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τοποθέτηση των δειγμάτων σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Για την ειδική χρώση της ακτίνης του κυτταροσκελετού των εμβρύων χρησιμοποιήθηκε η ουσία Rhodamine Phalloidin (Molecular Probes R415) (συζευγμένη με το φθοριόχρωμα TRITC) λόγω της υψηλής συγγένειας που παρουσιάζει για την F-ακτίνη. Μετά το πέρας της διαδικασίας του ανοσοφθορισμού έγινε επώαση των δειγμάτων σε FCS 10% για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ολονύκτια επώαση σε FCS 10% παρουσία χρωστικής σε αραιώση 1:20, στους 4 °C. Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 15 λεπτών σε PBS-DT και τοποθέτηση των δειγμάτων σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Στην περίπτωση χρώσης των εμβρύων με δύο αντισώματα οι επώσεις έγιναν διαδοχικά. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-SP5. Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με τα προγράμματα Leica LAS AF Lite, Fiji (Image J) και Photoshop CS6.

### 3.2.5. Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από έμβρυα zebrafish

Για την παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων συλλέχθηκαν δείγματα 30-50 εμβρύων zebrafish σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και έπειτα από συγκεκριμένες πειραματικές διαδικασίες. Πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των χορίων (όπου ήταν απαραίτητο) και τα αποχωριωμένα έμβρυα μεταφέρθηκαν σε φυγοκεντρικά σωληνάρια Eppendorf (1.5 ml) όπου ακολούθησαν 2 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS 1x. Στη συνέχεια τα έμβρυα τοποθετήθηκαν σε ψυχρό διάλυμα λύσης RIPA (3 μl/έμβρυο) ενισχυμένο με αναστολείς πρωτεασών και ομογενοποιήθηκαν με τη διαδοχική χρήση βελόνων διατομής 23Gx1'' και 27Gx1/2''. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν άμεσα στον πάγο για 5 λεπτά τουλάχιστον και φυγοκεντρήθηκαν στα 11.200xg, για 30 λεπτά στους 4 °C. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο, σε αυτό προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης 1x Laemmli (παρουσία DTT για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών), ακολούθησε βρασμός στους 95 °C για 5 λεπτά και αποθήκευση στους -20 °C.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο Bradford σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την κατασκευή της οποίας χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη ορού βοός (BSA) γνωστής συγκέντρωσης.

#### Κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τη μέθοδο Bradford

	Τυφλό	1	2	3	4	5
<b>BSA (1μg/μl)</b>	-	1 μl	2 μl	4 μl	8 μl	12 μl
<b>αντιδραστήριο Bradford</b>	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
<b>ddH<sub>2</sub>O (έως 1ml)</b>	800 μl	799 μl	798 μl	796 μl	792 μl	788 μl

Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 595 nm.

### 3.2.6. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου αποτελεί ευρύτατα διαδεδομένη μέθοδο για τον διαχωρισμό διαφορετικών πρωτεϊνών που συνυπάρχουν σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών καθώς αυτές μετακινούνται σε μια κατακόρυφη πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η πηκτή είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης είναι η καταλληλότερη για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών καθώς αποτελείται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και μπορεί να σχηματιστεί άμεσα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με βάση την αναλογία συγκεντρώσεων μονομερούς ακρυλαμίδης:δισ-ακρυλαμίδης. Η κατάλυση της αντίδρασης πολυμερισμού γίνεται με την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου APS και του TEMED (N,N,N,N-τετραμέθυλο-1,2-διάμινο-αιθάνιο), μιας βασικής ουσίας η οποία καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών από το APS.

Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται με την προσθήκη στο αρχικό μίγμα του διαλύματος φόρτωσης, συστατικά του οποίου είναι το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), ένας ανιονικός αποδιατακτικός παράγοντας ο οποίος προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες και το DTT (Dithiothreitol) ένας αναγωγικός παράγοντας ο οποίος προκαλεί διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών που αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η πλήρης αποδιάταξη επιτυγχάνεται μέσω βρασμού των δειγμάτων στους 95 °C. Η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής καθώς επιτελείται σε δύο διαδοχικές πηκτές: μία πηκτή επιστοίβαξης όπου οι πρωτεΐνες κινούνται με ίση ταχύτητα σαν μία ζώνη και της πηκτής διαχωρισμού όπου οι πρωτεΐνες αρχίζουν να παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα με τις μικρότερες σε μάζα να ταξιδεύουν ταχύτερα διαμέσου των σχηματιζόμενων πόρων και τις μεγαλύτερες να καθυστερούν.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που ελήφθησαν από έμβρυα zebrafish, ηλεκτροφορήθηκαν υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος.

### Προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμιδίου

[ 12 % ]	Πηκτική διαχωρισμού (Separating gel)	Πηκτική επιστοιβάξης (Stacking gel)
ddH <sub>2</sub> O	3.33 ml	2.9 ml
Acrylamide	4.17 ml	0.75 ml
Διάλυμα Διαχωρ. pH 8.8/ Επιστοιβ. pH 6.8	2.5 ml	1.25 ml
SDS 10%	100 μl	50 μl
APS 10%	100 μl	50 μl
TEMED	10 μl	10 μl

### 3.2.7. Ανοσοαποτύπωση Western

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Optitran, Whatman) για 70 λεπτά (200 mA) παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς. Για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας της μεταφοράς των πρωτεϊνών έγινε επώαση της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau S (0.1% σε οξικό οξύ 1%) για 1 λεπτό και άμεση πλύση με ddH<sub>2</sub>O και PBSTw 0.1%. Ακολουθούσε έπλυση της μεμβράνης με PBSTw 0.1% (3x5 λεπτά) και επώασή της σε διάλυμα αποκλεισμού (5% w/v άπαχο γάλα σε PBSTw 0.1%) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και σε 2% ζελατίνη (Cold water fish skin gelatin) για 10 λεπτά, με σκοπό τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε με το πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε 0.5% ζελατίνη είτε για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου είτε ολονυχτίως στους 4 °C, υπό συνεχή ανακίνηση. Η απομάκρυνση του μη δεσμευμένου πρωτογενούς αντισώματος έγινε με 3 πλύσεις με PBSTw 0.1% των 10 λεπτών. Ακολούθησε έκθεση της μεμβράνης σε κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP) αραιωμένο σε 5% γάλα, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανακίνηση. Τέλος, επαναλήφθηκαν 3 πλύσεις με PBSTw 0.1% των 10 λεπτών και η εμφάνιση του σήματος έγινε μετά από επώαση για 3 λεπτά, της μεμβράνης σε κατάλληλο υπόστρωμα (λουμινόλη) με σκοπό την ενεργοποίηση της αντίδρασης που καταλύει η υπεροξειδάση. Κατά την αντίδραση αυτή εκπέμπεται ακτινοβολία και το εκλυόμενο φως αποτυπώνεται με τη μορφή ζωνών σε φωτογραφικό φίλμ. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τοποθέτηση του φίλμ σε διάλυμα εμφάνισης (developer) και η σταθεροποίησή τους σε διάλυμα μονιμοποίησής (fixer). Η



αντίδραση ενισχυμένης χημειοφωταύγειας έγινε με τη χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου ECL (Pierce).

Η ανάλυση και η ποσοτικοποίηση των εντάσεων των ζωνών που αποτυπώθηκαν στο φωτογραφικό film έγινε με τη χρήση του προγράμματος Quantity One (Biorad). Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε σε σχέση με τις αντίστοιχες της α-τουμπουλίνης η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

### **3.2.8. Εργαλεία ανάδρομης γενετικής ανάλυσης**

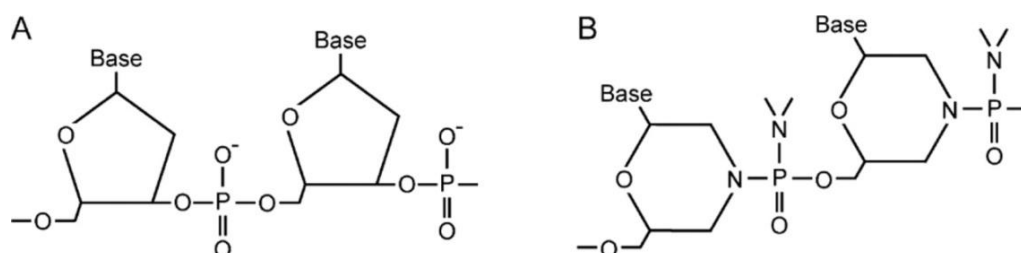
Αρχικά η τυπική διαδικασία γενετικής ανάλυσης για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό ενός γονιδίου ξεκινούσε με τη εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων σε μεγάλη κλίμακα οι οποίες οδηγούσαν στην ανάπτυξη συγκεκριμένων φαινοτύπων και κατέληγε με τον προσδιορισμό των μεταλλαγμένων γονιδίων (forward genetics, μεταλλαγμένος φαινότυπος → γονότυπος). Η εφαρμογή αυτής της διαδικασίας επέτρεψε την ανάλυση της γενετικής βάσης πολλών ανθρώπινων ασθενειών που συνδέονται με συγκεκριμένο φαινότυπο. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί στην εφαρμογή της μεθόδου ειδικότερα όσον αφορά την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό μεταλλάξεων από κάθε γονίδιο ξεχωριστά ειδικά όταν υπάρχει λειτουργική επικάλυψη μεταξύ διαφορετικών γονιδίων, όπως είναι γνωστό ότι συμβαίνει στο zebrafish λόγω γονιδιακού διπλασιασμού. Την λύση σε αυτό το πρόβλημα έδωσε η ανάπτυξη εργαλείων που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας επιλεγμένων γονιδίων μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης ή καταστολής έκφρασης, επιτρέποντας την αξιολόγηση των επαγόμενων φαινοτυπικών αλλαγών (reverse genetics, μεταλλαγμένος γονότυπος → φαινότυπος) (Lawson and Wolfe, 2011).

Η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος του zebrafish σε συνδυασμό με άλλα πλεονεκτήματα που έχει ως οργανισμός, το καθιστούν εξαιρετικό μοντέλο για τη λειτουργική μελέτη γονιδίων, ενώ ήδη έχουν εφαρμοστεί σε αυτό με επιτυχία πολλές μέθοδοι ανάδρομης γενετικής ανάλυσης προσφέροντας αξιόπιστα αποτελέσματα (Lawson and Wolfe, 2011).

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν πειράματα απώλειας λειτουργίας με τη χρήση δύο μεθόδων: της μικροέγχυσης ανινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης και του συστήματος CRISPR-Cas9, όπως περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

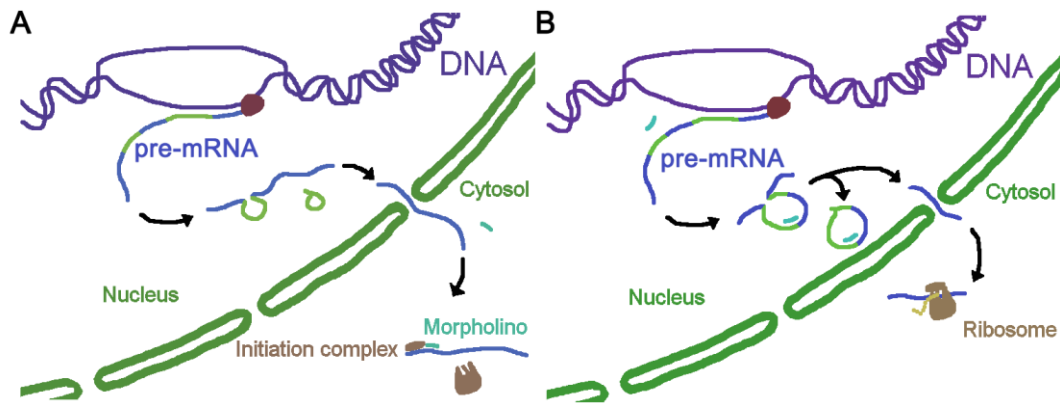
### 3.2.8.1. Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης (MO)

Τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης ή morpholinos (MO) είναι ολιγομερή μεγέθους 25 νουκλεοτιδίων και συνιστούν ανάλογα των τυπικών νουκλεοτιδίων (Εικόνα 3.4A) όπου ο δακτύλιος της (δεοξυ)ριβόζης έχει αντικατασταθεί από έναν 6-μελή δακτύλιο μορφολίνης και ο φωσφοδιεστερικός δεσμός από έναν μη-ιονικό φωσφοροδιαμιδικό (Εικόνα 3.4B). Τα χαρακτηριστικά αυτά επιτρέπουν στα MO να σχηματίζουν ετεροδιμερή με την αλληλουχία του μεταγράφου-στόχου μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων κατά Watson-Crick, ενώ παράλληλα δεν υφίστανται υδρόλυση από νουκλεάσες. Είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια και η απουσία φορτίου αποτρέπει οποιαδήποτε τυχαία αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά του κυττάρου (Eisen and Smith, 2008).



**Εικόνα 3.4.** (A) Δομή τυπικών νουκλεοτιδίων. (B) Δομή νουκλεοτιδίων μορφολίνης. Οι αζωτούχες βάσεις συνδέονται σε ένα εξαμελή δακτύλιο μορφολίνης και τα νουκλεοτίδια συγκρατούνται μέσω μη φορτισμένου φωσφοροδιαμιδικού δεσμού (Eisen and Smith, 2008).

Υπάρχουν δύο είδη ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης (MO) τα οποία διαφέρουν ως προς το μηχανισμό δράσης τους καθώς καταστέλλουν την έκφραση του γονιδίου είτε παρεμποδίζοντας τη διαδικασία της μετάφρασης (translation blocking morpholino, ATG-MO) (Εικόνα 3.5A) ή τη διαδικασία του ματίσματος του πρόδρομου mRNA (splicing blocking morpholino) (Εικόνα 3.5B).



**Εικόνα 3.5.** Μηχανισμός δράσης των αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης. **(Α)** Το ATG-MO προσδένεται στην 5' αμετάφραση περιοχή του ώριμου mRNA, παρεμποδίζοντας έτσι την μετακίνηση σε αυτό του ριβοσωμικού συμπλόκου και κατ' επέκταση την έναρξη της μετάφρασης. **(Β)** Το MO προσδένεται συμπληρωματικά στο πρόδρομο mRNA και παρεμβαίνει στη διαδικασία του ματίσματος οδηγώντας προς μετάφραση λάθος προϊόν.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τύποι ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης. Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των MO έγινε από την GeneTools LLC. Τα ολιγονουκλεοτίδια διαλυτοποιήθηκαν σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O, σε τελική συγκέντρωση 1 mmol/L. Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

MO	5' → 3'	Μηχανισμός δράσης
MOab	ACTTTCGCCCGCCGAGGCCGACATTA	Παρεμπόδιση μετάφρασης
MOb	TGAGTTATATTCCTCTCACCTTGT	Παρεμπόδιση ματίσματος
control MO	CCTCTTACCTCAgTTACAATTTATA	Μη-ειδική στόχευση

Για τα πειράματα μικροέγχυσης χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 5, 7.5 και 15 ng ολιγονουκλεοτιδίων σε τελικό όγκο 2.3 nl ανά έμβρυο. Οι ενέσεις έγιναν σε έμβρυα στο στάδιο 1-2 κυττάρων, με τη χρήση κατάλληλου συστήματος ενέσεων (Nanoliter 2000, WPI).

Τα έμβρυα στα οποία έγινε μικροέγχυση morpholinos (ή morphants) αξιολογήθηκαν στο στάδιο των 48 hpf ως προς τις επαγόμενες αλλαγές της μορφολογίας τους βάσει των οποίων κατηγοριοποιήθηκαν σε φαινότυπο όμοιο του φυσιολογικού (normal-like), ήπιο (mild), μέτριο (moderate) και δριμύ (severe).

Για τα πειράματα διάσωσης φαινότυπου, αρχικά πραγματοποιήθηκε *in vitro* μεταγραφή του cDNA της ανθρώπινης SET με τη χρήση του mMessage mMachine SP6 kit

(Ambion), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του *SET* mRNA μετρήθηκαν με τη χρήση φωτομέτρου μικρού όγκου Nanodrop και του Bioanalyzer 2100. Ακολούθησε τιτλοδότηση και ταυτόχρονη έγχυση 70 pg *SET* mRNA / 7.5 ng *setb* MO, σε έμβρυα στο στάδιο 1-2 κυττάρων. Η ανίχνευση των εγχυόμενων ουσιών έγινε μετά από προσθήκη της χρωστικής Phenol red.

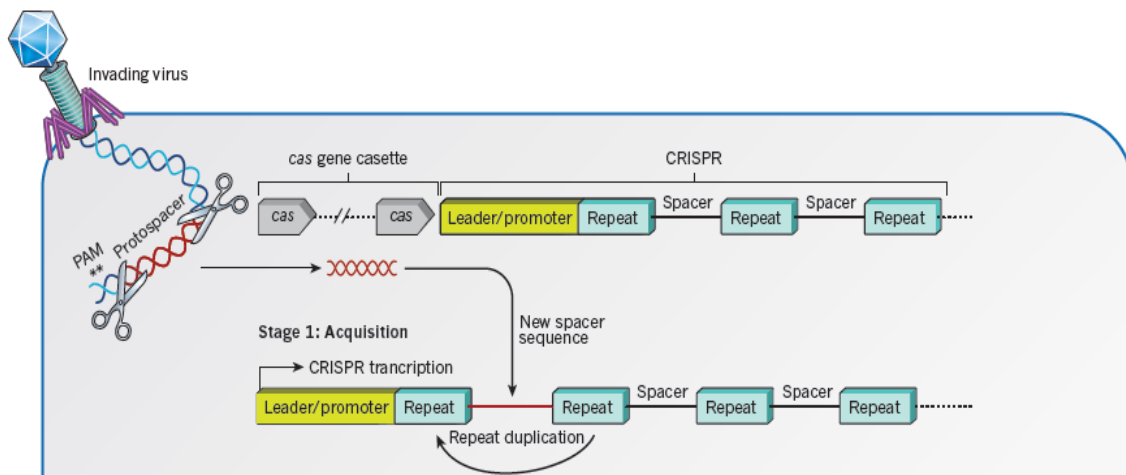
### 3.2.8.2. Σύστημα CRISPR-Cas9

Η ανακάλυψη του συστήματος CRISPR-Cas ως ένας μηχανισμός επίκτητης ανοσίας των προκαρυωτικών οργανισμών, υπήρξε το έναυσμα για την ανάπτυξη ενός νέου αποτελεσματικού και αξιόπιστου εργαλείου γενετικής επεξεργασίας.

#### *Το σύστημα CRISPR-Cas ως μηχανισμός άμυνας*

Η λειτουργία του CRISPR-Cas επιτρέπει στα βακτήρια και τα αρχαία να ανταποκρίνονται σε επιθέσεις ιών καταστρέφοντας το εισβάλλον γενετικό υλικό. Πρόκειται για έναν μηχανισμό άμυνας ο οποίος στηρίζεται στη σύνθεση μικρών μορίων RNA για την ειδική στόχευση έναντι του ξένου γενετικού υλικού και την επακόλουθη καταστροφή του.

Το σύστημα CRISPR-Cas αποτελείται από τα γονίδια *cas* τα οποία είναι οργανωμένα σε οπερόνιο και την συστοιχία CRISPR (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats) την οποία συνιστούν οι αλληλουχίες στόχευσης ξένου γονιδιώματος (Spacers) εκατέρωθεν των οποίων παρεμβάλλονται ολιγομερείς πανομοιότυπες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Repeats) (Εικόνα 3.6).

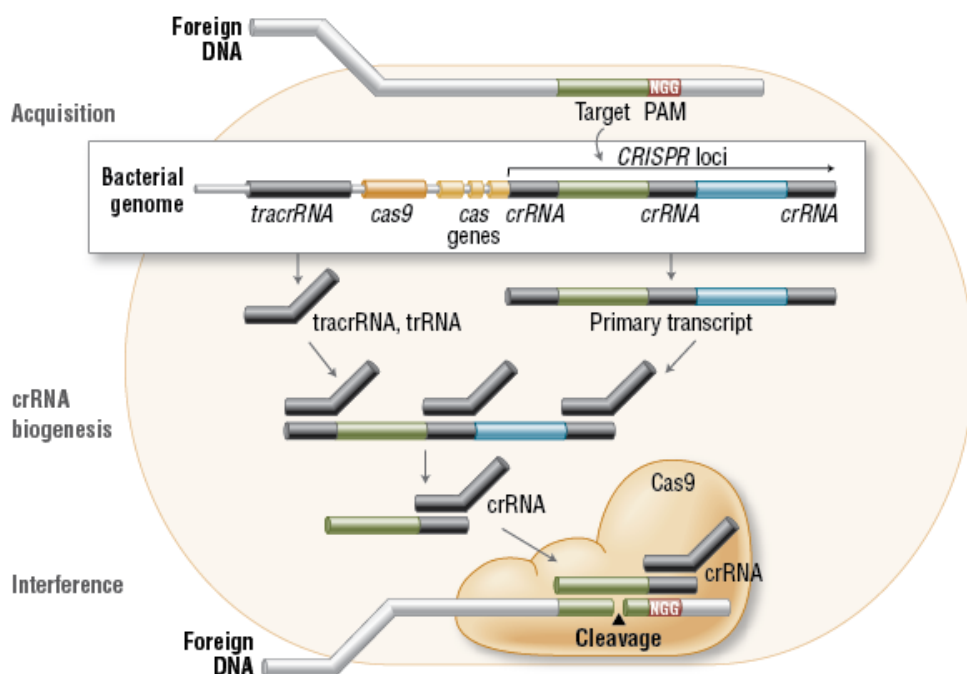


**Εικόνα 3.6.** Σχηματική απεικόνιση του οπερονίου των γονιδίων *cas* και της συστοιχίας CRISPR. Με κόκκινο χρώμα διακρίνεται η αλληλουχία του ιικού DNA που ενσωματώνεται μεταξύ δύο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στην έναρξη της συστοιχίας CRISPR, ως πρώτο στάδιο της ανοσολογικής απόκρισης (Wiedenheft *et al.*, 2012)

Η διαδικασία ανοσολογικής απόκρισης περιλαμβάνει τρία στάδια. Κατά την προσαρμοστική φάση, οι προκαρυωτικοί οργανισμοί που διαθέτουν τις αλληλουχίες CRISPR αποσπούν μικρά τμήματα ξένου DNA (Protospacers) και τα ενσωματώνουν στο χρωμόσωμά τους κοντά στο 5'- άκρο της συστοιχίας CRISPR. Η επιλογή των τμημάτων ξένου DNA συνοδεύεται από την ύπαρξη παρακείμενων μοτίβων της μορφής NGG, γνωστών ως PAMs (Protospacer Adjacent Motifs). Έπειτα οι αλληλουχίες αυτές μεταγράφονται παράγοντας τα πρόδρομα μόρια CRISPR RNA (pre-crRNA), από τα οποία μέσω περαιτέρω επεξεργασίας προκύπτουν τα μικρού μήκους μόρια crRNA. Σε αυτό το σημείο τα crRNA υβριδίζουν με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του ξένου DNA (Protospacers) καθοδηγώντας σε αυτά τα σημεία κατάλληλες ενδονουκλεάσες Cas. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη δράση των ενζύμων Cas τα οποία μεσολαβούν την καταστροφή της αλληλουχίας στόχου μέσω πρόκλησης δίκλωνων θραύσεων (Wiedenheft *et al.*, 2012).

Έχει αναγνωριστεί η ύπαρξη τριών τύπων συστημάτων CRISPR-Cas, εκ των οποίων ευρύτερα μελετημένος είναι ο δεύτερος. Στο σύστημα CRISPR-Cas τύπου II, ακολουθείται ένας διαφορετικός μηχανισμός επεξεργασίας του pre-crRNA που οδηγεί στη δημιουργία του trans-ενεργοποιητικού crRNA (tracrRNA)- συμπληρωματικού προς τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του pre-crRNA (Εικόνα 3.7). Το tracrRNA πυροδοτεί την επεξεργασία του pre-crRNA από την RNaseIII, προς τον σχηματισμό του ώριμου crRNA.

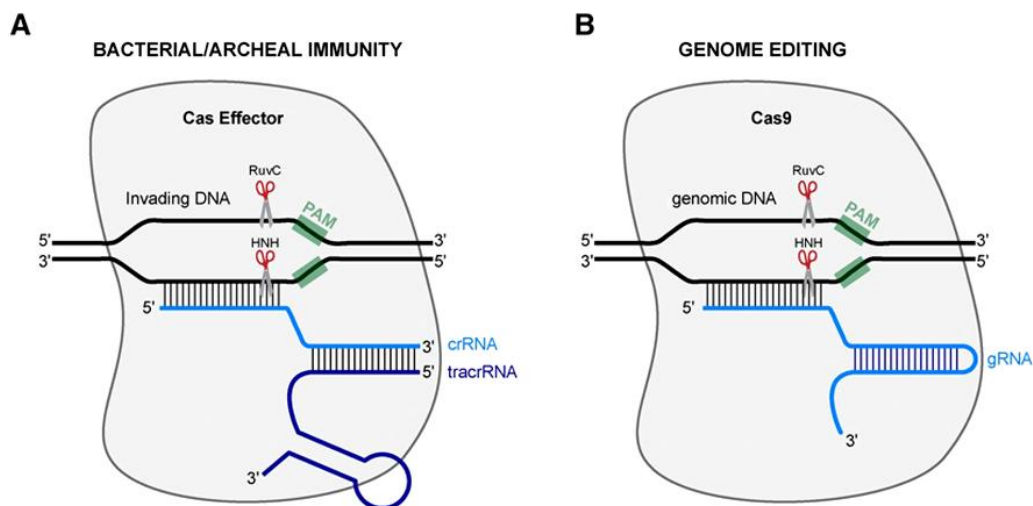
Επίσης στο συγκεκριμένο σύστημα έχει βρεθεί πως η καταστροφή του ξένου DNA αποδίδεται σε ένα μόνο ένζυμο, την Cas9. Οι ενδονουκλεάσες Cas9 συνιστούν μια οικογένεια ενζύμων των οποίων η δράση είναι διττή. Αφενός συμμετέχουν στην επεξεργασία του pre-crRNA και αφετέρου καταλύουν την διάσπαση του DNA-στόχου. Η στοχευμένη δράση της Cas9 προϋποθέτει τον σχηματισμό των μερικώς συμπληρωματικών διμερών tracrRNA:crRNA με τα οποία σχηματίζει σύμπλοκο. Ακόμη, η Cas9 δομικά χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δύο δομικών επικρατειών, της RuvC και της HNH. Κατά τη διάσπαση του DNA οι δύο υπομονάδες προκαλούν θραύσεις δίκλωνης αλυσίδας (DSBs) σε περιοχές οι οποίες προσδιορίζονται με βάση την ύπαρξη της αλληλουχίας-στόχου μήκους 20 νουκλεοτιδίων στην οποία έχει συνδεθεί συμπληρωματικά το crRNA. Απαραίτητη, για την δράση του ενζύμου είναι και η ύπαρξη στο 3' άκρο της αλληλουχίας-στόχου, του μοτίβου PAM. Το γονιδίωμα του ξενιστή δεν περιέχει αλληλουχίες PAM με αποτέλεσμα να προστατεύεται από την δράση της ενδονουκλεάσης (Εικόνα 3.7) (Jinek *et al.*, 2012; Westra *et al.*, 2014).



Εικόνα 3.7. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων δράσης του συστήματος CRISPR-Cas9 (τύπου II).

## Το σύστημα CRISPR-Cas από τη βακτηριακή ανοσία ως νέο εργαλείο γενετικής μηχανικής

Η δυνατότητα αξιοποίησης του συστήματος CRISPR-Cas τύπου II ως εργαλείο για την στοχευμένη επεξεργασία του γονιδιώματος παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 2012 από τις ερευνητικές ομάδες των Jennifer Doudna και Emmanuelle Charpentier (Jinek *et al.*, 2012). Στη συγκεκριμένη εργασία εκμεταλλεύτηκαν το σύστημα CRISPR-Cas II, το οποίο αποτελείται από τρία μόνο συστατικά (Cas9, tracrRNA, crRNA) και το απλοποίησαν ακόμη περισσότερο συνδυάζοντας τα δύο RNAs για την σύνθεση ενός ενιαίου μονόκλωνου οδηγού RNA (single guide RNA, sgRNA) (Εικόνα 3.8). Η χρήση του τροποποιημένου πλέον CRISPR-Cas συστήματος διευκολύνει την ευρεία εφαρμογή του στην τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του DNA η οποία απορρέει από την ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων (NHEJ, HDR) (Sander and Joung, 2014).



**Εικόνα 3.8.** Σύγκριση των συστημάτων CRISPR-Cas (A) στην βακτηριακή ανοσία και (B) στην επεξεργασία του γονιδιώματος.

Μέχρις στιγμής η μέθοδος CRISPR-Cas έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς τόσο σε επίπεδο κυτταρικών συστημάτων όσο και οργανισμών, μεταξύ των οποίων και στο zebrafish. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CRISPR/Cas9 για την στόχευση του γονιδίου *setb* σε έμβρυα zebrafish. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίζεται στο δημοσιευμένο πρωτόκολλο των Jao *et al.* (2013).

## Ταυτοποίηση περιοχής-στόχου gRNA και σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων gRNA

Η ταυτοποίηση της περιοχής στόχευσης του οδηγού RNA (gRNA) στο γονίδιο της *setb* έγινε με τη χρήση του λογισμικού CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu>). Η αλληλουχία στόχευσης είναι 5'-GGAAATAATGTCGGCCTCGG-3', βρίσκεται εντός του πρώτου εξωνίου και δεν περιλαμβάνει τη θέση PAM η οποία στον παρακάτω πίνακα είναι εντός παρενθέσεως. Βάσει αυτής σχεδιάστηκαν τα μόρια των εκκινητών για την κλωνοποίηση της αλληλουχίας-στόχου στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pT7-gRNA (Addgene #46759). Στους εκκινητές προστέθηκαν επιπλέον οι βάσεις 5'-TA ή 5'-AAAC ώστε η κλωνοποίηση της ένθεσης να γίνει με σωστό προσανατολισμό. Η αλληλουχία στόχευσης καθώς και οι αλληλουχίες των εκκινητών αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Αλληλουχία στόχευσης gRNA 5'-GG-N <sub>18</sub> -NGG-3'	Εξόνιο	Αλυσίδα	Εκκινητές (5'→3')
GGAAATAATGTCGGCCTCGG (CGG)	1	-	TA GGAAATAATGTCGGCCTCGG
			AAAC CCGAGGCCGACATTATTT

## Σύνθεση του gRNA και του mRNA της νουκλεάσης Cas9

Αρχικά πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση της αλληλουχίας gRNA στον πλασμιδιακό φορέα pT7-gRNA. Πρώτο βήμα ήταν ο υβριδισμός των εκκινητών (2 μl ο καθένας) παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος NEB3.1 σε τελικό όγκο 20 μl. Το μίγμα της αντίδρασης επώαστηκε στους 95 °C για 5 λεπτά και στους 50 °C για 10 λεπτά.

Ακολούθησε ο σχηματισμός του μίγματος της αντίδρασης κατά την οποία έγινε πέψη του φορέα με τα περιοριστικά ένζυμα BsmBI, BglIII και SalI (όπου τα δύο τελευταία χρησιμοποιήθηκαν ώστε να αποτραπεί η επανακυκλοποίηση του φορέα) και ταυτόχρονη δεσμοποίηση. Η σύσταση του μίγματος περιελάμβανε τα εξής: 1 μl μίγματος δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων (προηγούμενη αντίδραση), 400 ng πλασμιδιακού φορέα pT7-gRNA, 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος NEB3.1, 0.5 μl BsmBI, 0.3 μl BglIII, 0.3 μl SalI, 0.5 μl T4 DNA Ligase και ddH<sub>2</sub>O μέχρις τελικού όγκου 10 μl. Η αντίδραση έγινε σε θερμικό κυκλοποιητή ως εξής:



37 °C	20 min	3 κύκλοι
16 °C	15 min	1 κύκλος
37 °C	10 min	1 κύκλος
55 °C	15 min	1 κύκλος
80 °C	15 min	1 κύκλος

Μικρή ποσότητα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό βακτηρίων τα οποία επιστρώθηκαν σε τρυβλία άγαρ παρουσία Αμπικιλίνης. Ακολούθησε σάρωση αποικιών μέσω διαγνωστικών πέψεων με το ένζυμο BglII, καλλιέργεια της ανασυνδυασμένης αποικίας και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα.

Η σύνθεση του gRNA έγινε μετά από γραμμικοποίηση του πλασμιδίου με το περιοριστικό ένζυμο BamHI μέσω *in vitro* μεταγραφής χρησιμοποιώντας την T7 RNA Πολυμεράση του HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας. Ομοίως η σύνθεση του capped-mRNA της nls-Cas9-nls (pT3TS-nCas9n, Addgene #46757), έγινε μετά από γραμμικοποίηση του πλασμιδίου με το ένζυμο XbaI, χρησιμοποιώντας την T3 RNA Πολυμεράση του T3 mMessage mMachin Kit (Ambion), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δύο RNA δείγματα μετρήθηκαν ποσοτικά και ελέγχθηκαν ποιοτικά με τη χρήση Nanodrop και Bioanalyzer, αντίστοιχα. Οι πλασμιδιακοί χάρτες των pT7-gRNAs<sub>etb</sub> και pT3TS-nCas9n παρατίθενται στο Παράρτημα 1.

### Μικροενέσεις και έλεγχος αποτελεσματικότητας του gRNA

Συλλέχθηκαν έμβρυα zebrafish στα οποία έγινε μικροέγχυση 230 pg gRNA σε συνδυασμό με 690 pg Cas9 mRNA στο στάδιο του ενός κυττάρου. Εντός των επόμενων δύο ημερών παρακολούθηθηκε η πορεία της ανάπτυξης των εμβρύων και καταγράφηκαν οι επαγόμενες μορφολογικές διαφορές. Στο στάδιο των 48 hpf έγινε καταγραφική φαινοτύπων, όπως περιγράφεται στην ενότητα των ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης. Σε αυτό το στάδιο συλλέχθηκαν έμβρυα με χαρακτηριστικές αλλοιώσεις για την απομόνωση γενωμικού DNA.

Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε από μεμονωμένα έμβρυα με τη χρήση διαλύματος εκχύλισης γενωμικού DNA (50 µl/ έμβρυο). Ακολούθησε επώαση στους 55 °C για 4 ώρες, βρασμός στους 95 °C για 15 λεπτά ώστε να απενεργοποιηθεί η Πρωτεΐνάση K

που περιείχε το διάλυμα, σύντομη φυγοκέντρηση και αποθήκευση στους -20 °C. Το γενωμικό DNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο στην αντίδραση PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας εντός της οποίας βρισκόταν η περιοχή στόχευσης gRNA, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (*F*: 5'-CGCACTTCTAAACTGAGCTCGA-3', *R*: 5'-AGGAAACATCATGGCCTCCG-3'). Το μίγμα της αντίδρασης PCR σχηματίστηκε από την προσθήκη 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x, 0.5 μl MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μl dNTPs, 1μl από τον κάθε εκκινητή, 6 μl gDNA, 0.25 μl KAPA HiFi Πολυμεράσης και 10.75 μl αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O (τελικός όγκος 25 μl) (KAPA HiFi PCR Kit, KAPA Biosystems). Οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

Αρχική αποδιάταξη	95 °C , 2 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	98°C , 20 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	65 °C , 15 sec	25 κύκλοι
Επιμήκυνση	72 °C , 15 sec	
Τελική επιμήκυνση	72 °C , 5 min	1 κύκλος

Ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος PCR (411 bp) και ανάλυση μέσω αλληλούχισης Sanger προκειμένου να διαπιστωθεί η αποτελεσματική στόχευση του gRNA.

### 3.3. Απομόνωση ολικού RNA

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς εμβρύων 48 hpf (50 άτομα ανά πληθυσμό) ύστερα από μικροέγχυση ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης MOab, MOb καθώς και εμβρύων ελέγχου (control MO), αντίστοιχα (3 βιολογικά δείγματα ανά πληθυσμό). Η επιλογή των εμβρύων έγινε με κριτήριο τις μορφολογικές τους αλλοιώσεις. Η απομόνωση έγινε με τη χρήση του RNeasy Mini Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου Nanodrop ενώ η ποιότητα και η ακεραιότητα των δειγμάτων RNA εκτιμήθηκαν με αναλυτή Bioanalyzer.

### 3.4. Ανάλυση μικροσυστοιχιών

Οι μικροσυστοιχίες DNA έχουν αποτελέσει μια εκ των πιο διαδεδομένων μεθόδων ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης. Πρόκειται για μία μέθοδο, η ευρεία εξάπλωση της οποίας αποδίδεται στον εύκολο χειρισμό, τη μεγάλη διάχυση της τεχνολογίας και το σχετικά χαμηλό κόστος. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο συνδυασμό της ιδιότητας υβριδοποίησης του DNA και στην πρόοδο της νανοτεχνολογίας που επιτρέπει την ακινητοποίηση μεγάλου αριθμού μορίων σε μικρο-πλακίδια με μεγάλη ακρίβεια. Σε ένα πείραμα γονιδιακής έκφρασης, το πλακίδιο σχεδιάζεται έτσι ώστε να περιέχει χαρακτηριστικά τμήματα DNA των γονιδίων του υπό μελέτη οργανισμού. Τα τμήματα αυτά είναι μονόκλωνα, ονομάζονται ανιχνευτές (probes) και μπορούν να υβριδοποιηθούν με συμπληρωματικά τμήματα cDNA των αντίστοιχων γονιδίων τα οποία έχουν σημειωθεί με φθορίζουσα ουσία. Τόσο η ποιοτική ανίχνευση όσο και η ποσοτικοποίηση του mRNA γίνονται μέσω της μέτρησης φθορισμού που εκπέμπεται όταν τα δύο συμπληρωματικά μόρια υβριδοποιηθούν.

Η ανάλυση μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ολικού RNA που απομονώθηκαν από *set* morphants (MOab) και έμβρυα στα οποία είχε γίνει μικροέγχυση μη ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης (control MO) (τρία βιολογικά δείγματα ανά ομάδα). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα μικροσυστοιχιών Affymetrix GeneChip Zebrafish Gene 1.0 Arrays, τα χαρακτηριστικά της οποίας συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 2.** Χαρακτηριστικά της πλατφόρμας μικροσυστοιχιών GeneChip Zebrafish Gene 1.0

Critical Specifications	
Number of arrays in set	One
Number of transcripts	~14,900
Number of probe sets	15,509
Feature size	18 $\mu$ m
Oligonucleotide probe length	25-mer
Probe pairs/sequence	16
Control sequences included:	
Hybridization controls:	<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , and <i>cre</i>
Poly-A controls:	<i>dap</i> , <i>lys</i> , <i>phe</i> , and <i>thr</i>
Housekeeping/Control genes:	GAPDH, alpha 1 Actin
Detection sensitivity	1:100,000*

\*As measured by detection in comparative analysis between a complex target containing spiked control transcriptions and a complex target with no spikes.

Τα δείγματα RNA χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA με τη χρήση του Ambion WT Expression Kit (Life Technologies, cat. number 4411974). Στη συνέχεια το cDNA υποβλήθηκε σε κατακερματισμό και τα επιμέρους τμήματα σημάνθηκαν με φθορίζουσα ουσία μέσω του Affymetrix GeneChip WT Terminal Labeling and Controls Kit (cat. number 901524). Ο υβριδισμός των σημασμένων μορίων cDNA με τους συμπληρωματικούς DNA ανιχνευτές (probe) της πλατφόρμας μικροσυστοιχιών, για 16 ώρες στους 45 °C, υπό ανακίνηση (60 rpm), έγινε με το Affymetrix Gene Chip Hybridization, Wash and Stain Kit (cat. number 900720). Ακολούθησε πλύση και χρώση των μικροσυστοιχιών με το Affymetrix Fluidics Station 450 και σάρωση της πλατφόρμας με τον Hewlett-Packard Gene Array Scanner 3000 7G. Η ποιότητα των δεδομένων αξιολογήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Expression Console (version 1.3, Affymetrix). Περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού GeneSpring 13.0 (Agilent Technologies)

Τα πρωτογενή δεδομένα που ελήφθησαν από την πειραματική διάταξη και προέκυψαν από την υβριδοποίηση των μορίων cDNA στις αλληλουχίες των ανιχνευτών, αφορούσαν την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού (GC-RMA, GeneChip-Robust Multiarray Averaging) σε λογαριθμική κλίμακα ( $\log_2FC$ ). Ο προσδιορισμός των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων έγινε μετά από σύγκριση των κανονικοποιημένων μέσω των τιμών έντασης των τριών βιολογικών δειγμάτων των morphants σε σχέση με τα αντίστοιχα των δειγμάτων ελέγχου. Ως στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα γονίδια με διαφορά έκφρασης  $FC > 1.7$  και  $p < 0.05$  μετά από στατιστική ανάλυση Student's *t*-test (unpaired, two-tailed). Η ανάλυση των μικροσυστοιχιών έγινε στο Ευρωπαϊκό Κέντρο Μοριακής Βιολογίας (EMBL Genomics Core Facility), και η επεξεργασία των δεδομένων έγινε από την Δρ. Κατερίνα Σουψανά με τη χρήση του προγράμματος GeneSpring 13.0.

### **3.5. Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου**

Η ποσοτική ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων, επιτεύχθηκε μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR ή qPCR), μιας εξαιρετικά ευαίσθητης και αξιόπιστης μεθόδου ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης.

Αρχικά, μέσω αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής συντέθηκαν cDNAs με τη χρήση του SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix Kit (Invitrogen), όπου ως

εκμαγεία χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα ολικού RNA που είχαν απομονωθεί από morphants (MOab, MOb) και έμβρυα ελέγχου (control MO), στο στάδιο των 48 hpf. Το μίγμα της αντίδρασης qPCR συστάθηκε με την προσθήκη 5 μl μίγματος 2x Precision SYBR Green MasterMix (Primer Design), 0.25 μl από τον κάθε εκκινητή, 2 μl δείγματος cDNA (προαραιωμένου 1:12) και 2.5 μl νερού ελεύθερου- νουκλεασών. Η διαδικασία της αντίδρασης qPCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή Lightcycler 2.0 (σύστημα τριχοειδών, Roche) και περιείχε τα παρακάτω βήματα:

Αρχική αποδιάταξη	94°C , 15 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	94 °C , 15 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	60 °C , 20 sec	45 κύκλοι
Επιμήκυνση	72 °C , 10 sec	

Για κάθε βιολογικό δείγμα παρασκευάστηκαν τριπλές αντιδράσεις. Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης κάθε γονιδίου έγινε με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού cDNA. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία του κάθε γονιδίου-στόχου του οργανισμού *Danio rerio* σύμφωνα με τη Βάση Δεδομένων NCBI. Η λίστα των γονιδίων που αναλύθηκαν στην οποία περιλαμβάνονται οι αντίστοιχοι αριθμοί ταυτοποίησης (NCBI Gene ID) και οι αλληλουχίες των πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών, παρατίθεται στον Πίνακα 2 (Παράρτημα 4). Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το *sdha* και το *rpl13*, τα οποία παρέχονται από το geNorm Reference Kit (Primer Design). Η κανονικοποίηση και ανάλυση των δεδομένων εκτελέστηκε με το πρόγραμμα qBase Plus (Biogazelle). Ο προσδιορισμός της στατιστικώς σημαντικής διαφορικής έκφρασης των γονιδίων-στόχων ελέγχθηκε με τη χρήση Student's *t*-test (unpaired, two-tailed) με *p*-value<0.05.

### 3.6. Έκθεση εμβρύων zebrafish στο φάρμακο Fingolimod (FTY720)

Για την μελέτη των επιπτώσεων της φαρμακολογικής αναστολής της SET σε επίπεδο οργανισμού, χρησιμοποιήθηκε η χημική ουσία FTY720 (2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl)]-1,3-propanediol hydrochloride). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει την έκθεση εμβρύων zebrafish σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις φαρμάκου αραιωμένου σε διάλυμα εμβρύων E3 1x. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν έμβρυα zebrafish στο στάδιο των 24 ωρών μετά τη γονιμοποίηση, από τα

οποία αρχικά αφαιρέθηκε το προστατευτικό χόριο με τη χρήση κατάλληλων βελονών. Έπειτα, τα έμβρυα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο των 6 φρεατίων (10 έμβρυα/ δείγμα) με τις εξής συγκεντρώσεις φαρμάκου FTY720 : 0, 1, 5, 7.5 και 10  $\mu\text{M}$  σε διάλυμα εμβρύων E3, σε τελικό όγκο 5 ml. Η ανάπτυξη των εμβρύων καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας γινόταν σε επωαστικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28.5 °C. Η διάρκεια της έκθεσης των εμβρύων στο FTY720 δεν ξεπερνούσε τις τέσσερις ημέρες κατά τις οποίες η ανανέωση του φαρμάκου γινόταν καθημερινά και τα έμβρυα παρατηρούνταν για φαινοτυπικές αλλαγές και θνησιμότητα. Στο στάδιο των 4 ημερών μετά τη γονιμοποίηση όπου έχει παρέλθει η εμβρυική ανάπτυξη και ο οργανισμός χαρακτηρίζεται προνύμφη, πραγματοποιήθηκε *in vivo* χρώση των αισθητήριων οργάνων της πλευρικής γραμμής (νευρομαστοί) με τη χρωστική FM1-43 ή συλλέχθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα για περαιτέρω ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης Western.

### **3.7. *In vivo* χρώση εμβρύων zebrafish με Acridine Orange**

Η χρώση με τη φθορίζουσα ουσία Acridine Orange αποτελεί μία εναλλακτική μέθοδο μελέτης απόπτωσης *in vivo*. Η διαδικασία της χρώσης εφρμόστηκε σε ζωντανά έμβρυα ελέγχου και morphants στο στάδιο των 48 hpf. Τα έμβρυα εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα Acridine Orange (Sigma) τελικής συγκέντρωσης 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (αραιωμένο σε E3 1x), για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες σκότους. Ακολούθησαν 3 πλύσεις σε διάλυμα E3 1x και αναισθητοποίηση σε tricaine 0.016%. Η παρατήρηση των εμβρύων έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

### **3.8. *In vivo* χρώση των νευρομαστών με τη χρωστική FM1-43**

Η χρώση των νευρομαστών της πλευρικής γραμμής έγινε με τη χρήση της ζωτικής φθορίζουσας χρωστικής SynaptoGreen C4 (FM1-43) (Biotium). Πρόκειται για μία λιπόφιλη ουσία η οποία εκπέμπει φθορισμό μόλις έρθει σε επαφή με τη μεμβράνη των κυττάρων. Στην περίπτωση των ενεργών νευρώνων, η χρωστική ενσωματώνεται στα ανακυκλούμενα συναπτικά κυστίδια οδηγώντας στην εκπομπή φθορισμού αυξημένης έντασης στην περιοχή των νευρικών απολήξεων. Η ιδιότητα αυτή καθιστά την εν λόγω

χρωστική εξαιρετικό δείκτη μεταγωγής σήματος. Αντίστοιχα συμβαίνει και στην περίπτωση των αισθητήριων κροσσωτών κυττάρων των νευρομαστών τα οποία ως απόκριση μηχανικού ερεθίσματος απελευθερώνουν νευροδιαβιβαστές. Στην παρούσα εργασία η χρωστική FM1-43 χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική ανάλυση των ενεργών νευρομαστών: μετά από α) μικροέγχυση ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης, β) μικροέγχυση gRNA+ mRNA Cas9 όπως και γ) μετά από έκθεση των εμβρύων στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις του φαρμάκου FTY720.

Μετά την ολοκλήρωση της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας συλλέχθηκαν τα άτομα των πειραματικών πληθυσμών και των ομάδων ελέγχου στο στάδιο των 4 dpf και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου Eppendorf όπου έγιναν δύο πλύσεις με διάλυμα εμβρύων E3 1x. Ακολούθησε η διαδικασία χρώσης με 3  $\mu$ M FM1-43 διαλυμένης σε E3 1x, για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνθήκες σκότους και η απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής έγινε με τρεις γρήγορες πλύσεις με διάλυμα E3. Οι προνύμφες ακινητοποιήθηκαν μετά από επώαση με την αναισθητική ουσία tricaine 0.016% και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η παρατήρηση και καταμέτρηση των ενεργών νευρομαστών έγινε με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου, τμηματικά στην περιοχές του κεφαλιού και της ουράς και αφορούσε τη μία πλευρά του σώματος.

### 3.9. Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS (version 22, IBM). Αρχικά τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε έλεγχο ισότητας διακυμάνσεων μέσω του Levene's test (με βάση την μηδενική υπόθεση  $H_0: \sigma^2_A = \sigma^2_B$ ). Ο έλεγχος των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών των ανεξάρτητων δειγμάτων έγινε με ανάλυση διακυμάνσεων One Way ANOVA ακολουθούμενη από κατάλληλη *post-hoc* ανάλυση ανά ζεύγη. Συγκεκριμένα στην περίπτωση των ίσων διακυμάνσεων χρησιμοποιήθηκε το Tukey's HSD *post-hoc* test, ενώ στην περίπτωση απόρριψης του ελέγχου Levene (άνισες διακυμάνσεις) έγινε χρήση της ανάλυσης Welch-ANOVA και του Games-Howel *post-hoc* test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σφάλμα μέσης τιμής, θεωρώντας ως σημαντική τη διαφορά όπου  $p < 0.05$ .





## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Οι ορθόλογες πρωτεΐνες της SET, Seta και Setb στο zebrafish

Το zebrafish αποτελεί χαρακτηριστική περίπτωση οργανισμού το γονιδίωμα του οποίου υπέστη προ εκατομμυρίων χρόνων, διπλασιασμό. Ωστόσο σήμερα το μεγαλύτερο ποσοστό γονιδιακών αντιγράφων έχει εκλείψει. Η αλληλούχιση του γονιδιώματός του αποκάλυψε την ύπαρξη 25 χρωμοσωμάτων στα οποία κατανέμονται περίπου 26.000 κωδικοποιά γονίδια, περισσότερα από κάθε άλλο σπονδυλωτό οργανισμό. Η σύγκριση των κωδικοποιών γονιδίων του zebrafish και του ανθρώπου, έδειξε πως για το 72% των ανθρώπινων γονιδίων υπάρχει ένα τουλάχιστον ορθόλογο στο zebrafish (Howe *et al.*, 2013).

Ως οργανισμός διαθέτει το μεγαλύτερο ποσοστό γενετικών επαναλήψεων (~52%) σε σχέση με κάθε άλλο σπονδυλωτό (~30%) (Howe *et al.*, 2013). Ως εκ τούτου η αξιοποίησή του ως ένα *in vivo* σύστημα για τη μελέτη ενός γονιδίου προϋποθέτει την αναζήτηση ύπαρξης γονιδιακού αντιγράφου και τελικά τον λειτουργικό χαρακτηρισμό του ενός ή και των δύο παράλογων γονιδίων. Η πρωτεΐνη SET (ισομορφή TAF1β), η οποία αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη πρωτεΐνη καθώς απαντάται σε όλες τις μεγάλες ομάδες οργανισμών. Στο zebrafish υπάρχουν δύο ορθόλογα γονίδια *seta* και *setb* που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες Seta και Setb (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3.** Πληροφορίες σχετικά με την ανθρώπινη πρωτεΐνη SET και τις Seta, Setb του zebrafish.

	<b>SET</b>	<b>Seta</b>	<b>Setb</b>
<b>Locus</b>	Chromosome 9: 128,683,424- 128,696,400 forward GRCh38:CM000671.2	Chromosome 8: 2,526,713-2,533,111 reverse GRCz10:CM002892.1	Chromosome 21: 13,130,056- 13,133,937 reverse GRCz10:CM002905.1
<b>mRNA</b>	2915 bp	1835 bp	1862 bp
<b>Protein</b>	277 αα	269 αα	275 αα
<b>Ensembl</b>	ENSG00000119335 ENST00000322030.12	ENSDARG00000031495 ENSDART00000049109.5	ENSDARG00000003920 ENSDART00000023834.6
<b>NCBI</b>	NM_003011, NP_003002	NM_201475, NP_958883	NM_201468, NP_958876
<b>Uniprot</b>	Q01105	Q7ZUY0	F1R3I6
<b>ZFIN</b>	–	ZDB-GENE-030131-2221	ZDB-GENE-030131-433

#### 4.1.1. Σύγκριση των αλληλουχιών των Seta και Setb με την ανθρώπινη ορθόλογη και φυλογενετική ανάλυση

Προκειμένου να διαπιστωθεί ο βαθμός ομοιότητας μεταξύ των τριών πρωτεϊνών Seta, Setb και SET σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής, πραγματοποιήθηκε στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των τριών πρωτεϊνών με τη χρήση του προγράμματος Πολλαπλής Στοίχισης Clustal Omega. Βάσει της σύγκρισης αυτής η οποία κατέδειξε την ύπαρξη ελάχιστων αμινοξικών διαφορών κυρίως στις περιοχές του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου, προέκυψε η υψηλή ομολογία μεταξύ των Seta/b και της SET (Εικόνα 4.1).

```

Set a  MSASAAKVSCKELNSMHDGGDETSEKEQZEAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKY 60
Set b  MSASAAKVSREQNSMHDGADETSEKEQZEAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKY 60
SET    MSAPAAKVSCKELNSMHDGADETSEKEQZEAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKY 60
      ***  *****:*  ***** .*****

Set a  NKLRQPFQKRSELI AKIPNFWVTFVNHPQVSALLGEEDEEALHYLTRVEVTEFEDIKS 120
Set b  NKLRQPFQKRSELI AKIPNFWVTFVNHPQVSALLGEEDEEALHYLTRVEVTEFEDIKS 120
SET    NKLRQPFQKRSELI AKIPNFWVTFVNHPQVSALLGEEDEEALHYLTRVEVTEFEDIKS 120
      *****

Set a  GYRIDFYFDENMYFENKVL SKEIHLNESGDPSTKSTEIKWKPGKDLTSRSSQTQSKAGKK 180
Set b  GYRIDFYFDENPYFENKVF SKEFHLNESGDPSSKSTEIKWKAGKDLTKRTGQTPNKAGKK 180
SET    GYRIDFYFDENPYFENKVL SKEFHLNESGDPSSKSTEIKWKS GKDLTKRSSQTQNKASRK 180
      *****  *****:*:*  *****:*  *****  ***** .*: .** .**.*

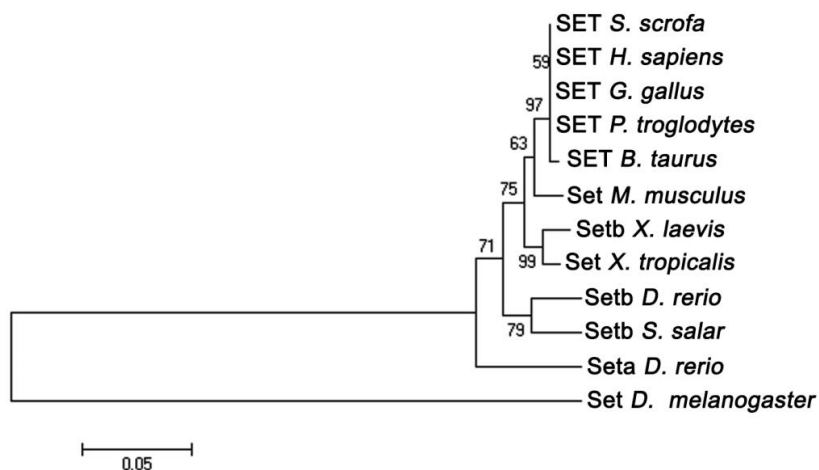
Set a  RQHEEPESFFTFWTDHADSGADELGEVIKDDIWPNPLQYYLVPDMEDEEGEGEDED-- 237
Set b  RQHEEPESFFTFWTDHSDAGADELGEVIKDDIWPNPLQYYLVPDMEDEEGEGEEDD-EE 239
SET    RQHEEPESFFTFWTDHSDAGADELGEVIKDDIWPNPLQYYLVPDMEDEEGEGEEDDDDE 240
      *****:*:*  *****:*  *****:*  *****:*  *****:*

Set a  DEEGLDDIDEEGDDGEEEDDDGEDDEGDDD----- 269
Set b  EE EGLEIDIDEEGDEDDGEEDEEEDGEDGEGDDGEDD- 275
SET    EE EGLEIDIDEEGDEDEGEDEDDDEGEEGEEDGEGEDD 277
      :****:*  *****:*  ***::: *  ::*:*

```

Εικόνα 4.1. Σύγκριση των πρωτεϊνών Seta, Setb και SET σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής. Η στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών Seta (269 αα), Setb (277 αα) και SET (275 αα), έγινε με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega.

Επιπλέον διερευνήθηκε η εξελικτική σχέση μεταξύ των παράλογων πρωτεϊνών Seta, Setb του zebrafish με τις ορθόλογες πρωτεΐνες άλλων οργανισμών. Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών επιλέχθηκαν έτσι ώστε να αντιπροσωπεύουν τις κυριότερες ομάδες οργανισμών όπως θηλαστικά, ψάρια, αμφίβια, τρωκτικά και πτηνά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης η SET χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των οργανισμών (Εικόνα 4.2). Ειδικότερα όσον αφορά το zebrafish (*Danio rerio*) παρότι απέχει εξελικτικά από τον άνθρωπο αυτή η απόσταση δεν αντικατοπτρίζεται σε επίπεδο πρωτεϊνών, όπως επιβεβαιώνεται μετά από συγκριτική ανάλυση των αμινοξικών τους αλληλουχιών με τη χρήση του αλγορίθμου BLAST. Σύμφωνα με αυτή την ανάλυση οι αλληλουχίες των Seta και Setb είναι ταυτόσημες με την αλληλουχία της SET σε ποσοστά 95% και 96%, αντίστοιχα.



**Εικόνα 4.2.** Φυλογενετική ανάλυση. Η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου έγινε με τη χρήση του αλγορίθμου ομαδοποίησης Neighbor-Joining. Οι αριθμοί που αναγράφονται σε κάθε κόμβο αντιστοιχούν σε ποσοστά bootstrap τα οποία προέκυψαν μετά από ανάλυση 500 επαναλήψεων. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη χρήση της μεθόδου p-distance και η γραμμή κλίμακας αφορά τον αριθμό των αμινοξικών αντικαταστάσεων ανά 100 κατάλοιπα. Η φυλογενετική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα MEGA6. Αριθμοί εισόδου αλληλουχίας στη Βάση Δεδομένων GenBank των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν: SET *Sus scrofa* (NP\_001231019.1), SET *Homo sapiens* (NP\_003002.2), SET *Gallus gallus* (NP\_001025862), SET *Pan troglodytes* (JAA\_08258.1), SET *Bos taurus* (NP\_001033653.1), SET2 *Mus musculus* (NP\_001191804), SET *Xenopus laevis* (NP\_001079909), SET *Xenopus (silurana) tropicalis* (NP\_989041), SETB *Salmo salar* (ACH70631.1), Seta και Setb *Danio rerio* (NP\_958883.1 και NP\_958876.1, αντίστοιχα). Η Set *Drosophila melanogaster* (NP\_650438.2) χρησιμοποιήθηκε ως εξωομάδα.

## 4.2. Προσδιορισμός των προτύπων έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb* κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του zebrafish

Απαραίτητο βήμα για την κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων *seta/b* στα πλαίσια της εμβρυογένεσης και πρώιμης ανάπτυξης ήταν ο προσδιορισμός των περιοχών έκφρασής τους σε επίπεδο μεταγράφου. Δεδομένης της υψηλής ομοιότητας που χαρακτηρίζει τις αλληλουχίες των δύο γονιδίων και προκειμένου να διασφαλιστεί η ανίχνευση του κάθε μεταγράφου ξεχωριστά, αξιοποιήθηκε η μέθοδος του *in situ* υβριδισμού μετά από σχεδιασμό ειδικών RNA ιχνηθετών. Ο σχεδιασμός έγινε με βάση τις 3'-αμετάφραστες περιοχές των μορίων mRNA όπου εντοπίζεται το υψηλότερο ποσοστό διαφορών καθώς σε αυτές συσσωρεύεται πλήθος μεταλλάξεων, ενώ επιπλέον εξειδίκευση εξασφαλίστηκε μέσω του μεγέθους των ιχνηθετών που ξεπερνούσε τις 400 βάσεις. Η ανάλυση έγινε σε τρία διακριτά στάδια εμβρύων (24 hpf, 48 hpf) και προνυμφών (5 dpf) zebrafish, ώστε να διερευνηθούν χωροχρονικά τα μοτίβα έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb*.

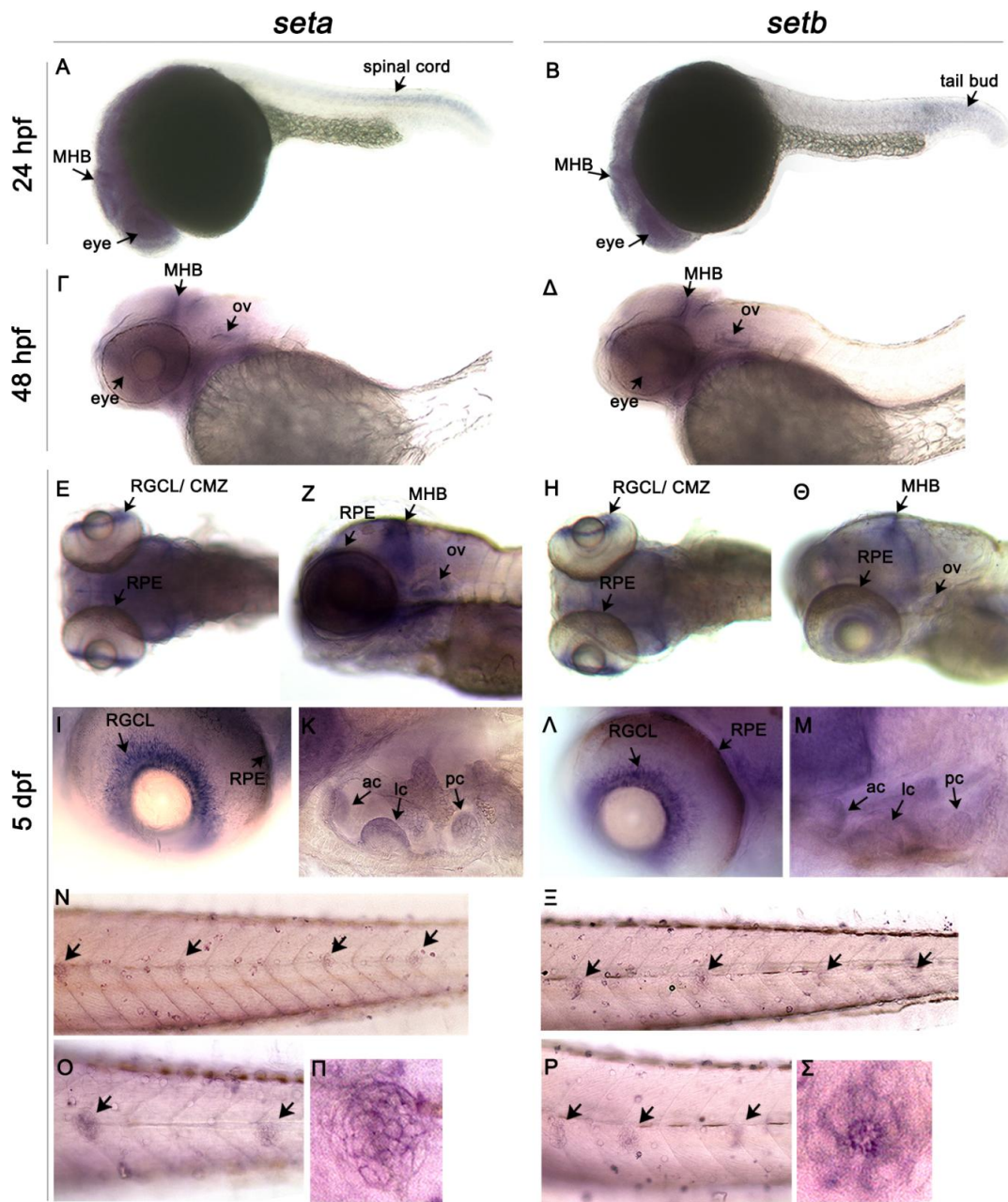
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα *in situ* υβριδισμού, τα μεταγράφα των γονιδίων *seta* και *setb* παρουσιάζουν παρόμοια πρότυπα κατανομής. Συγκεκριμένα, στις 24 hpf διακρίνονται αυξημένα επίπεδα mRNA στην περιοχή του εγκεφάλου με πιο έντονη χρώση να εμφανίζεται στην περιοχή του ορίου μεταξύ του μεσεγκεφάλου και του οπίσθιου εγκεφάλου (MHB) και στους οφθαλμούς ενώ σε χαμηλότερη ένταση εντοπίζεται έκφραση του *seta* στον νωτιαίο μυελό (spinal cord) και του *setb* στο άκρο της ουράς (tail bud) (Εικόνα 4.3A,B). Στο επόμενο εμβρυικό στάδιο που χρησιμοποιήθηκε γι' αυτή τη μελέτη, των 48 hpf, η αυξημένη έκφραση των δύο γονιδίων στην περιοχή του εγκεφάλου διατηρείται, με σαφή έντονη χρώση να εντοπίζεται στους οφθαλμούς, στο όριο μεσεγκεφάλου-οπίσθιου εγκεφάλου και το ωτικό κυστίδιο (otic vesicle, ov), ενώ δεν ανιχνεύθηκε αξιόλογη έκφραση κανενός εκ των δύο mRNA στο υπόλοιπο σώμα των εμβρύων (Εικόνα 4.3Γ,Δ).

Κατά την προνυμφική ανάπτυξη και ειδικότερα στο στάδιο των 5 dpf όπου όλες οι δομές είναι πλήρως διαμορφωμένες και μεγαλύτερων διαστάσεων, η έκφραση των γονιδίων συνεχίζει να κυριαρχεί στην περιοχή του κεφαλιού. Υψηλότερα επίπεδα mRNA ανιχνεύονται στο όριο μεσεγκεφάλου-οπίσθιου εγκεφάλου (Εικόνα 4.3Z,Θ) και στους οφθαλμούς όπου χαρακτηριστική είναι η χρώση στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (RGCL) (Εικόνα 4.3 E, H, I, Λ), στην ακτινωτή οριακή ζώνη

(CMZ) (Εικόνα 4.3E, H) και στο μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς (RPE) (Εικόνα 4.3E-I,Λ). Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση απεικονίζεται η έντονη κατανομή των μεταγράφων εντός της ωτικής κοιλότητας στις τρεις ακουστικές ακρολοφίες (εμπρόσθια-ac, πλευρική-lc, οπίσθια-pc) οι οποίες αποτελούνται από δεσμίδες αισθητήριων κροσσωτών κυττάρων (Εικόνα 4.3K,M). Αντίθετα με τις προηγούμενες περιπτώσεις, στο στάδιο των 5 dpf εντοπίστηκε έκφραση των *seta/b* μεταγράφων σε αξιόλογα επίπεδα και στην περιοχή της ουράς. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε η έκφραση των δύο mRNA στα αισθητήρια όργανα του συστήματος της πλευρικής γραμμής, τους νευρομαστούς (Εικόνα 4.3N-O,P). Η παρουσίαση των δομών αυτών σε μεγαλύτερη μεγέθυνση και σε διαφορετικά επίπεδα εστίασης αναδεικνύει την έκφραση των γονιδίων τόσο στα στηρικτικά όσο και στα κροσσωτά κύτταρα που τις απαρτίζουν (Εικόνα 4.3Π,Σ αντίστοιχα). Αναφορικά με τη διαμόρφωση του νευρικού συστήματος, σημαντική είναι η έκφραση των δύο γονιδίων στην περιοχή του εγκεφάλου που ορίζει το όριο μεταξύ του μεσεγκεφάλου και του οπίσθιου εγκεφάλου (MHB). Το MHB σχηματίζεται πολύ νωρίς κατά την εμβρυογένεση και ο ρόλος του είναι καθοριστικός για την περαιτέρω ανάπτυξη του ΚΝΣ καθώς λειτουργεί ως οργανωτής ισθμού. Πρόκειται, δηλαδή, για ένα κέντρο σηματοδότησης το οποίο μέσω απελευθέρωσης μεταγραφικών και αυξητικών παραγόντων, ελέγχει την τοπική εξειδίκευση των παρακείμενων νευροεπιθηλιακών δομών.

Αντίστοιχο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανομή των μεταγράφων στην περιοχή της ακτινωτής οριακής ζώνης (CMZ) η οποία αποτελεί τη ζώνη πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων του οφθαλμού. Η συγκεκριμένη περιοχή αποτελείται από βλαστικά και προγονικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς από τα οποία θα προκύψουν όλοι οι επιμέρους νευρώνες. Ακόμη, κατά την ενήλικη ζωή του zebrafish, η έκθεση σε παράγοντες ή η πρόκληση βλαβών που μπορεί να οδηγήσουν σε καταστροφή συγκεκριμένων στιβάδων αντιμετωπίζεται μέσω της διαδικασίας αναγέννησης για την οποία είναι υπεύθυνη η CMZ (Fischer *et al.*, 2014).

Συνολικά, προκύπτει ότι πέραν της ομοιότητας που φέρουν τα προϊόντα των γονιδίων *seta* και *setb* σε επίπεδο αλληλουχίας, χαρακτηρίζονται επίσης από κοινό πρότυπο έκφρασης. Ειδικότερα καταδεικνύεται η χωροχρονική συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb* με την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και συγκεκριμένα των αισθητήριων οργάνων του zebrafish.



**Εικόνα 4.3.** Ανίχνευση των περιοχών έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb* μέσω *in situ* υβριδισμού. Παρουσιάζεται το πρότυπο κατανομής των μεταγράφων κατά τα εμβρυικά στάδια των 24 hpf (**A, B**) και 48 hpf (**Γ, Δ**). Στις 5 dpf η έκφραση των γονιδίων είναι σαφώς διακριτή στο όριο μεσεγκεφάλου-οπίσθιου εγκέφαλου, στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς και στο μελάγχρον επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς (**E-Θ**). Χρώση των στιβάδων RGCL, CMZ και RPE σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (**I,Λ**). Εντοπισμός έκφρασης των γονιδίων στις αισθητήριες ακρολοφίες της ωτικής κοιλότητας (**K, M**). Η ανίχνευση των *seta/b* μεταγράφων στους νευρομαστούς τις πλευρικής γραμμής υποδεικνύεται με βέλη (**N, Ξ** και **O, P** σε μεγέθυνση). Σε αυξημένη εστίαση είναι ορατή η ανίχνευση των μεταγράφων στα στηρικτικά και κροσσωτά κύτταρα των νευρομαστών (**Π,Σ** αντίστοιχα). (MHB: όριο μεσεγκεφάλου-οπίσθιου εγκεφάλου, RGCL: στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων αμφιβληστροειδούς, CMZ: ακτινωτή οριακή ζώνη, RPE: μελάγχρον επιθήλιο αμφιβληστροειδούς, ov: ωτικό κυστίδιο, ac: εμπρόσθια ακρολοφία, lc: πλευρική ακρολοφία, pc: οπίσθια ακρολοφία)

### **4.3. Προσδιορισμός των προτύπων έκφρασης των πρωτεϊνών Seta και Setb κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του zebrafish**

Επόμενο βήμα ήταν η ταυτοποίηση των περιοχών έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων σε επίπεδο πρωτεΐνης καθώς και η σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την ανάλυση των μεταγράφων.

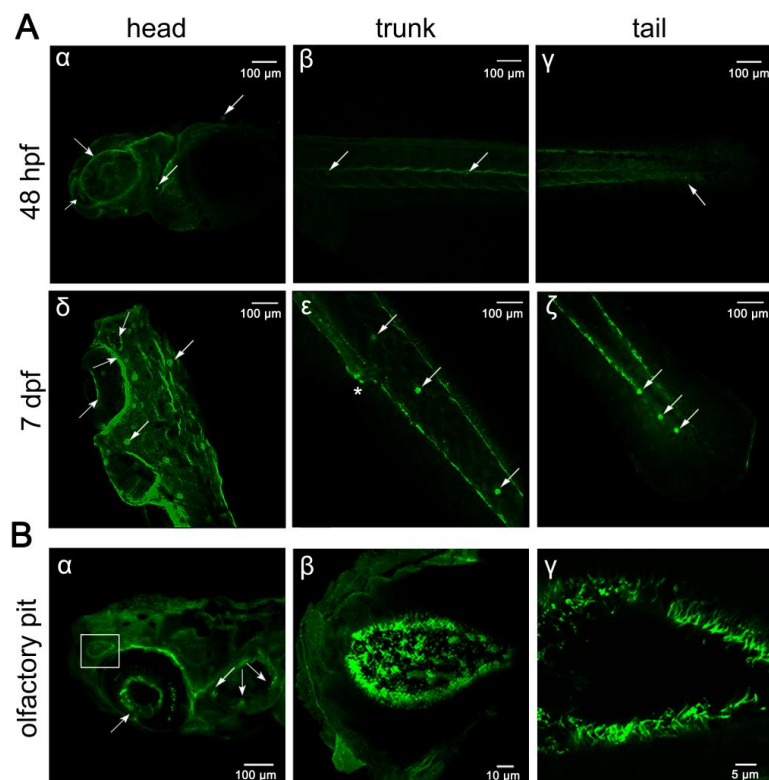
Στα πλαίσια αυτά χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο αντίσωμα (anti-Set, Παράρτημα 2, Εικόνα 1 Α-Γ), ειδικά σχεδιασμένο έναντι της αμινοτελικής περιοχής της Setb, ωστόσο εξαιτίας της υψηλής ταυτότητας των αμινοξικών τους αλληλουχιών αναγνωρίζει και τις δύο πρωτεΐνες. Επομένως το πρότυπο έκφρασης που αναλύθηκε μέσω πειραμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού αφορά ταυτόχρονα τα προϊόντα και των δύο γονιδίων.

Ομοίως με την προηγούμενη μελέτη, αποσκοπώντας στη χωροχρονική ανάλυση του μοτίβου έκφρασης των δύο πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν δύο στάδια ανάπτυξης από την εμβρυική (48 hpf) και την προνυμφική (7 dpf) ηλικία του οργανισμού. Η επιλογή των συγκεκριμένων σταδίων δεν ήταν τυχαία καθώς στις 48 hpf η μορφογενετική διαδικασία και η οργανογένεση έχουν σχεδόν ολοκληρωθεί προετοιμάζοντας το έμβρυο για την εκκόλαψη και τη μετάβαση σε προνύμφη. Αντίστοιχα στις 7 dpf, όλα τα όργανα είναι σχηματισμένα, έχουν διαφοροποιηθεί και είναι πλήρως λειτουργικά. Επιπλέον, η ανάλυση των επιπέδων των δύο πρωτεϊνών κατά την εμβρυογένεση και πρώιμη ανάπτυξη μέσω ανοσοαποτύπωσης Western έχει δείξει σταδιακή αύξηση της έκφρασής τους (Παράρτημα 2, Εικόνα 1Δ) καθιστώντας έτσι ευκολότερη την ανίχνευσή τους ακόμη και στις μικρότερου μεγέθους δομές.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα ανοσοφθορισμού, οι δύο πρωτεΐνες παρουσιάζουν ίδια κατανομή και στα δύο στάδια που μελετήθηκαν διαφέροντας ωστόσο στα επίπεδα έκφρασης, όπως είναι εμφανές από την αυξημένη ένταση φθορισμού στις 7 dpf (Εικόνα 4.4Α). Οι Seta/b ανιχνεύονται στην οσφρητική κοιλότητα, στους οφθαλμούς και ειδικότερα γύρω από τον φακό (RGCL) και περιμετρικά του αμφιβληστροειδούς (RPE) (Εικόνα 4.4Α-α,δ και Βα), στην πλευρική γραμμή και στους νευρομαστούς οι οποίοι είναι σαφώς διακριτοί στις 7 dpf (Εικόνα 4.4Αα-ζ). Ακόμη στο στάδιο της προνύμφης έντονη είναι η έκφραση των πρωτεϊνών και στην ουρογεννητική οπή (Εικόνα 4.4Αε, αστερίσκος).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανομή στο οσφρητικό επιθήλιο και ειδικότερα στους κροσσούς των κυττάρων (Εικόνα 4.4Βα, β-γ σε αυξημένη εστίαση). Ο σχηματισμός των

δομών αυτών ξεκινά στο στάδιο των 17 hpf ως μία μάζα κυττάρων εξωδερμικής προέλευσης τα οποία αποκτούν την τελική τους μορφή στις 32 hpf. Καθοριστικό για τη λειτουργία τους είναι το στάδιο των 48 hpf καθώς μορφολογικά μεταπίπτουν από πλακώδες σε κροσσωτό επιθήλιο. Η ύπαρξη και η λειτουργία των κροσσών είναι καθοριστική για την αίσθηση της όσφρησης καθώς αφορά την πρόσληψη οσμογόνων ουσιών του περιβάλλοντος η οποία διαμεσολαβείται από συγκεκριμένους επιφανειακούς υποδοχείς (Ενότητα 2.7.1.1). Δομικά χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη αξονήματος, μιας δομής του κυτταροσκελετού όπου οι μικροσωληνίσκοι έχουν διάταξη 9+0 ή 9+2. Στην περίπτωση των κροσσών των αισθητήριων οσφρητικών νευρώνων έχουν βρεθεί και οι δύο διαμορφώσεις, μόνο που στην περίπτωση των 9+2 απουσίαζαν οι βραχίονες δυνείνης (Wloga *et al.*, 2009).



**Εικόνα 4.4. Πρότυπο κατανομής των πρωτεϊνών Seta/b κατά την πρόιμη ανάπτυξη του zebrafish.** (A) Ανοσολογική ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη χρήση του αντισώματος anti-Set σε έμβρυο 48 hpf (α-γ) και προνύμφη 7dpf (δ-ζ). Με βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις εντοπισμού στο οσφρητικό επιθήλιο, τους οφθαλμούς και τους νευρομαστούς της πλευρικής γραμμής. (B) Έκφραση των Seta/b στην οσφρητική κοιλότητα. (α) Προβολή σε μεγέθυνση του κεφαλιού προνύμφης 7 dpf: εντός πλαισίου διακρίνεται το οσφρητικό επιθήλιο, με βέλος επισημαίνεται η χρώση της στιβάδας των γαγλιακών κυττάρων παρακείμενα του φακού, ενώ με τρία βέλη υποδεικνύεται η χρώση των αισθητήριων κροσσωτών ακρολοφιών της ωτικής κοιλότητας. (β,γ) Η κατανομή των πρωτεϊνών στους κροσσούς του οσφρητικού επιθηλίου σε αυξημένη εστίαση.



Αναφορικά με την έκφραση των *Seta/b* στους οφθαλμούς, η εικόνα επιβεβαιώνει την αντίστοιχη από την ανάλυση μέσω *in situ* υβριδισμού, καθώς και σε αυτή την περίπτωση αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών εντοπίζεται στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (RGCL) και στο μελάγχρουν επιθήλιο (RPE). Η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων είναι η πρώτη στιβάδα του αμφιβληστροειδούς η οποία κατανέμεται περιμετρικά του φακού και αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από γαγγλιακά κύτταρα. Οι νευράξονες των GCs σχηματίζουν το οπτικό νεύρο το οποίο μεταφέρει την οπτική πληροφορία στον οπτικό φλοιό. Τα εν λόγω κύτταρα είναι τα πρώτα που αναπτύσσονται κατά τη μορφογενεση του οφθαλμού. Στις 15 hpf αρχίζει να σχηματίζεται το RPE (Ενότητα 2.7.1.4) ενώ στις 48 hpf η διαστρωμάτωση του αμφιβληστροειδή έχει καλύψει σχεδόν όλη την έκταση του χιτώνα. Η οργάνωση των κυτταρικών στιβάδων ολοκληρώνεται στις 72 hpf οπότε και θεωρείται ότι ο οργανισμός έχει λειτουργική όραση (Avanesov and Malicki, 2010; Fadool and Dowling, 2008; Neuhauss, 2010).

Σχετικά με τον εντοπισμό των πρωτεϊνών στην ωτική κοιλότητα, παρότι δεν παρουσιάζεται σε μεγάλη μεγέθυνση, διακρίνεται και σε αυτήν την περίπτωση η έκφρασή τους στις τρεις ακουστικές ακρολοφίες. Οι εν λόγω δομές βρίσκονται εντός των τριών ημικυκλικών καναλιών και συνίστανται από αισθητήρια κροσσωτά κύτταρα στην κορυφαία επιφάνεια των οποίων προβάλλουν κινητοί κροσσοί (διάταξη 9+2) (Ενότητα 2.7.2.3). Τα ημικυκλικά κανάλια αρχίζουν να αναπτύσσονται στις 45 hpf ακολουθώντας μια σειρά επιθηλιακών εγκολπώσεων από τα τοιχώματα της ωτοκύστης προς το εσωτερικό του αυλού και εντός των επόμενων 10 ωρών ο σχηματισμός τους ολοκληρώνεται. Εσωτερικά των προβολών των ημικυκλικών καναλιών σχηματίζονται οι αισθητήριες ακρολοφίες. Στο στάδιο των 4 dpf, οι προνύμφες διαθέτουν πλήρως λειτουργικά ότα (Kimmel *et al.*, 1995; Whitfield *et al.*, 2002).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η έκφραση των *Seta/b* στην ουρογεννητική οπή καθώς πρόκειται για μια βασική δομή του σώματος των ψαριών. Μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού της αποτελεί τη μοναδική έξοδο του σώματος των ψαριών, εξυπηρετώντας ταυτόχρονα τρία συστήματα: το γαστρεντερικό, το ουροποιητικό και το αναπαραγωγικό.

Η έκφραση των πρωτεϊνών στο σύστημα της πλευρικής γραμμής και ειδικότερα στους νευρομαστούς, αναλύθηκε διεξοδικά και παρουσιάζεται λεπτομερώς παρακάτω.

Από τα μέχρι τώρα δεδομένα σχετικά με το πρότυπο κατανομής των προϊόντων έκφρασης των γονιδίων *seta/b*, συμπεραίνεται πως τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης υπάρχει άμεση σύνδεση με την ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ωστόσο παραμένει άγνωστο πώς η παρουσία και η δράση των *Seta/b* σε αυτές τις δομές, σχετίζεται με την ανάπτυξη ή/και τη λειτουργία τους.

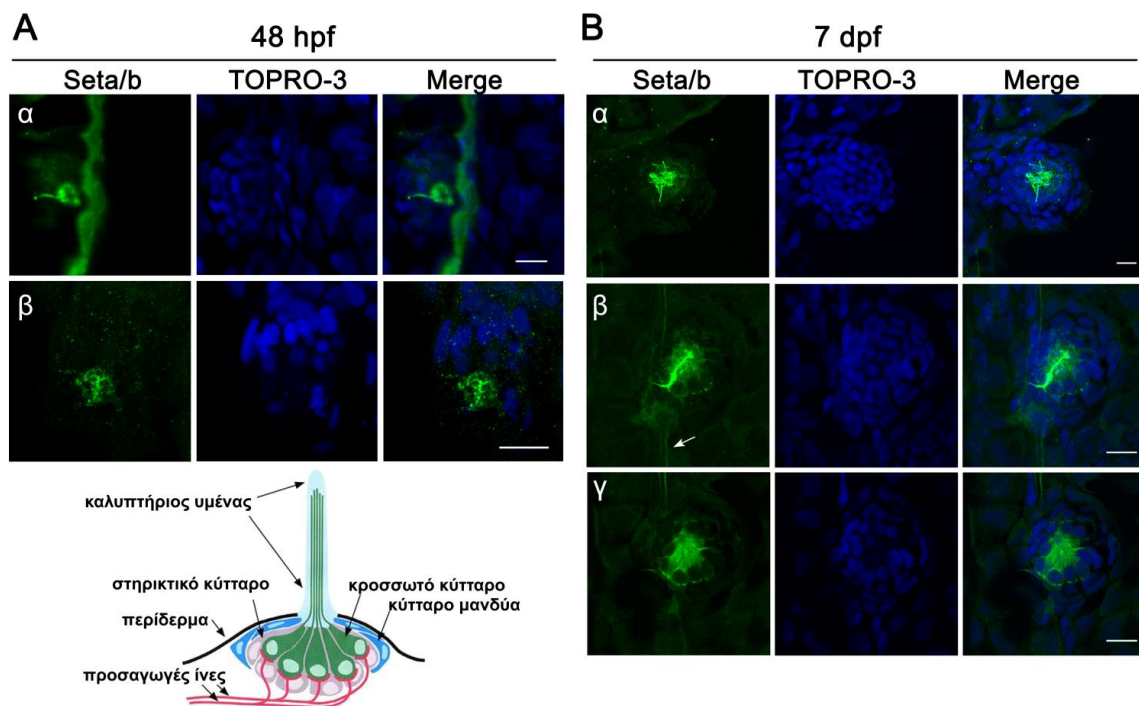
#### **4.4. Εντοπισμός έκφρασης των πρωτεϊνών *Seta* και *Setb* στο σύστημα της πλευρικής γραμμής**

##### **4.4.1. Εντοπισμός στα κροσσωτά κύτταρα των νευρομαστών**

Από τα προηγούμενα πειράματα προέκυψε η έκφραση των *Seta/b* στους νευρομαστούς τόσο εμβρύων όσο και προνυμφών zebrafish. Οι νευρομαστοί χαρακτηρίζονται δομικά από την ύπαρξη δύο ειδών κυττάρων: τα αισθητήρια κροσσωτά κύτταρα (hair cells) και τα βοηθητικά κύτταρα (accessory cells). Τα βοηθητικά κύτταρα διακρίνονται στα κύτταρα του μανδύα (mantle cells) και τα στηρικτικά κύτταρα (support cells). Χαρακτηριστικό γνώρισμα των κροσσωτών κυττάρων στο οποίο οφείλουν και το όνομά τους είναι ένα σύνολο μεμβρανικών προεκβολών που εκφύονται στην κορυφαία τους πλευρά και συνιστά μία δέσμη αισθητήριων κροσσών (hair bundle). Η δέσμη αυτή περιβάλλεται από ένα προστατευτικό στρώμα εξωκυττάριας ζελατινώδους ουσίας εσωτερικά ενός καλυπτήριου υμένα (cupula) ο οποίος προβάλλει εντός του υδάτινου περιβάλλοντος (Εικόνα 4.5Γ) (Dambly-Chaudiere *et al.*, 2003).

Δεδομένης της κυτταρικής σύστασης των αισθητήριων αυτών οργάνων, εξετάστηκε κατά πόσον η κατανομή των πρωτεϊνών είναι ευρεία ή περιορίζεται σε κάποιο συγκεκριμένο τύπο κυττάρων, παρότι η ανάλυση του προτύπου κατανομής των μεταγράφων έδειξε καθολική έκφραση. Πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός εμβρύων 48 hpf και προνυμφών 7 dpf, με το αντίσωμα anti-Set και ταυτόχρονη χρώση των πυρήνων με τη χρωστική TOPRO-3 (όπως περιγράφεται στις Μεθόδους, Ενότητα 3.2.4). Από την παρατήρηση των εικόνων με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σε αυξημένη ανάλυση, διαπιστώθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών στα κροσσωτά κύτταρα με εντονότερο φθορισμό να διακρίνεται στην κορυφαία τους πλευρά και συγκεκριμένα στους κροσσούς, αντίστοιχα

και για τα δύο στάδια ανάπτυξης (Εικόνα 4.5A-αβ, B-αβ). Παράλληλα η χρώση των πυρήνων ανέδειξε το σχήμα ροζέττας που χαρακτηρίζει τους νευρομαστούς και διευκόλυνε τον προσδιορισμό της υποκυτταρικής κατανομής, ειδικότερα στην περίπτωση των προνυμφών όπου το μέγεθος των νευρομαστών είναι σαφώς μεγαλύτερο. Σύμφωνα με την Εικόνα 4.5B-γ, οι Seta/b κατανέμονται εκτός των κροσσών και στο σώμα των αισθητήριων νευρώνων όπου πέραν του κυτταροπλάσματος εντοπίζονται και στις μεμβράνες τις βασικής τους πλευράς όπου τα κύτταρα αυτά επικοινωνούν με τις απολήξεις των προσαγωγών και απαγωγών νευρώνων. Τέλος, σχετικά έντονο σήμα παρατηρείται και στους δύο νευρώνες που συνδέουν τους νευρομαστούς με τον οπίσθιο εγκέφαλο για τη μεταγωγή χημικών σημάτων από και προς αυτόν (Εικόνα 4.5B-βγ).



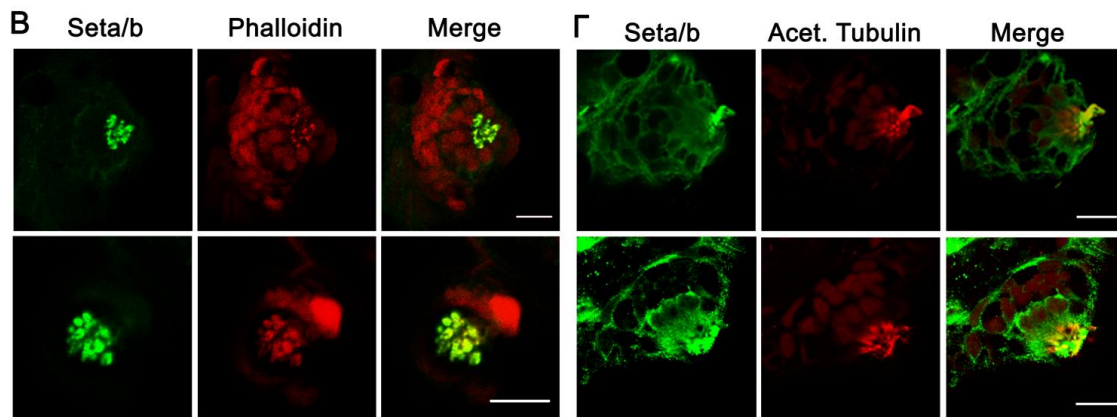
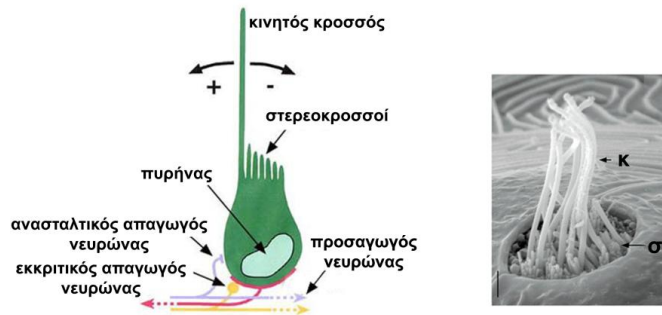
**Εικόνα 4.5.** Έκφραση των Seta/b στους νευρομαστούς της πλευρικής γραμμής. Ανοσολογική χρώση των νευρομαστών με τη χρήση του αντισώματος anti-Set (A-α,β) σε έμβρυα 48 hpf και (B) σε προνύμφες 7 dpf όπου διακρίνεται η κατανομή των πρωτεϊνών στους κροσσούς, το κυτταρόπλασμα και τη μεμβράνη των κροσσωτών κυττάρων (α-γ). Με βέλος υποδεικνύεται η χρώση των προσαγωγών/απαγωγών νευρώνων. Η χρώση των πυρήνων έγινε με τη χρωστική TOPRO-3. Γραμμή κλίμακας 10 μm. (Γ) Η μορφολογία του νευρομαστού. Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός ώριμου νευρομαστού και των κυττάρων που τον απαρτίζουν (Dambly-Chaudiere *et al.*, 2003).

#### 4.4.2. Εντοπισμός στους στερεούς και τους κινητούς κροσσούς των νευρομαστών

Τα κροσσωτά κύτταρα των νευρομαστών αποτελούνται από δύο τύπους κροσσών: τους στερεοκροσσούς (stereocilia) και έναν κινητό κροσσό (kinocilium) (Εικόνα 4.6Α). Μια μηχανική κίνηση των στερεοκροσσών ως αποτέλεσμα δόνησης του νερού, οδηγεί σε μεταβολή της κατάστασης πόλωσης του κυττάρου και έχει ως συνέπεια την απελευθέρωση και μεταγωγή χημικών σημάτων στον εγκέφαλο μέσω των προσαγωγών νευρώνων (Dambly-Chaudiere *et al.*, 2007; Ghysen and Dambly-Chaudiere, 2007; Williams and Holder, 2000). Εκτός από το μέγεθος τους, τον αριθμό και την λειτουργία, οι δύο τύποι κροσσών διακρίνονται και ως προς τον κυτταροσκελετό. Συγκεκριμένα οι στερεοκροσσοί χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο πυκνά πακεταρισμένων ινιδίων ακτίνης, ενώ οι κινητοί κροσσοί αποτελούνται από το αξόνημα διάταξης 9+2 (Kindt *et al.*, 2012).

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση των Seta/b στους δύο τύπους κροσσών, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι δείκτες. Η έκφραση των πρωτεϊνών στους στερεοκροσσούς ελέγχθηκε μετά από σήμανση με φαλλοϊδίνη (συζευγμένη με ροδαμίνη) η οποία αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στην F-ακτίνη, τη μορφή της δομικής αυτής πρωτεΐνης που απαντάται στα ινίδια. Αντίθετα για τη σήμανση των κινητών κροσσών χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (κλώνος 6-11B-1). Η ακετυλίωση της  $\alpha$ -τουμπουλίνης στη Λυσίνη K40, αποτελεί μια χαρακτηριστική μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία έχει βρεθεί ότι είναι συντηρημένη σε όλους τους οργανισμούς. Η συγκεκριμένη τροποποίηση προσδίδει εξαιρετική σταθερότητα στους μικροσωληνίσκους οι οποίοι εξυπηρετούν σκοπούς μεταφοράς οργανιδίων και μακρομορίων στους άξονες των νευρώνων καθώς και εκείνων που σχηματίζουν το αξόνημα των κινητών κροσσών (Al-Bassam and Corbett, 2012).

Πραγματοποιήθηκε συνδυαστική χρώση των νευρομαστών προνυμφών zebrafish 7 dpf, με το αντίσωμα anti-Set και τη χρωστική φαλλοϊδίνη ή το αντίσωμα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης για τη σήμανση των στερεοκροσσών και κινητών κροσσών αντίστοιχα. Η παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο κατέδειξε την έκφραση των πρωτεϊνών Seta/b στους στερεούς (Εικόνα 4.6B) και τους κινητούς κροσσούς (Εικόνα 4.6Γ) εφόσον και στις δύο περιπτώσεις είναι εμφανής ο συνεντοπισμός του anti-Set με τον αντίστοιχο δείκτη.

**A**

**Εικόνα 4.6.** Έκφραση των *Seta/b* στους κροσσούς των αισθητήριων κυττάρων των νευρομαστών. **(Α)** Μορφολογικά χαρακτηριστικά ενός κροσσωτού κυττάρου. Δεξιά η εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, δείχνει τις προεκβολές των κινητών κροσσών (κ) και των στερεοκροσσών (σ), μετά από πρωτεολυτική αφαίρεση του καλυπτήριου υμένα (Dambly-Chaudiere *et al.*, 2003; Williams and Holder, 2000). **(Β)** Ανίχνευση των πρωτεϊνών στους στερεοκροσσούς προνυμφών 7 dpf, μετά από χρώση με το αντίσωμα anti-Set (πράσινο) και τη χρωστική φαλλοϊδίνη (κόκκινο). **(Γ)** Ανίχνευση των πρωτεϊνών στους κινητούς κροσσούς προνυμφών 7 dpf, μετά από χρώση με το αντίσωμα anti-Set (πράσινο) και το αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (κόκκινο). Γραμμή κλίμακας 10  $\mu\text{m}$ .

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα, είναι σαφές πως η έκφραση των *Seta/b* στα κροσσωτά κύτταρα και ειδικότερα ο εντοπισμός τους στους δύο τύπους κροσσών, συνδέεται με τη λειτουργία των εν λόγω αισθητήριων κυττάρων. Το συγκεκριμένο εύρημα είναι σημαντικό γιατί υποδεικνύει έναν βασικό λειτουργικό ρόλο των πρωτεϊνών στη διαδικασία πρόσληψης μηχανικών ερεθισμάτων, άρα και την επικοινωνία του οργανισμού με το περιβάλλον μέσω των νευρομαστών.

#### **4.5. Μελέτη του φυσιολογικού ρόλου των γονιδίων *seta* και *setb* μέσω πειραμάτων καταστολής έκφρασης**

Από την ανάλυση του προτύπου κατανομής των γονιδίων *seta/b* διαπιστώθηκε ότι η έκφραση τους συνδέεται με τις δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο φυσιολογικός ρόλος των γονιδίων *seta/b* στην εμβρυογένεση και πρόωμη ανάπτυξη του zebrafish πραγματοποιήθηκαν πειράματα παρεμπόδισης της γονιδιακής έκφρασης. Οι δύο στρατηγικές που ακολουθήθηκαν αφορούσαν τη στόχευση των γονιδίων σε επίπεδο RNA, μέσω μικροέγχυσης αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης και σε επίπεδο DNA, αξιοποιώντας το σύστημα CRISPR-Cas9.

##### **4.5.1. Μελέτη των επιπτώσεων καταστολής της έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb* μέσω μικροέγχυσης αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης**

Τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνης (MO) είναι συνθετικά νουκλεοτίδια ανάλογα των τυπικών, τα οποία προκύπτουν από την αντικατάσταση του πενταμελούς δακτυλίου της ριβόζης με έναν εξαμελή δακτύλιο μορφολίνης καθώς και από την αντικατάσταση του αρνητικά φορτισμένου φωσφοδιεστερικού δεσμού με έναν μη-ιοντικό φωσφοροδιαμιδικό δεσμό.

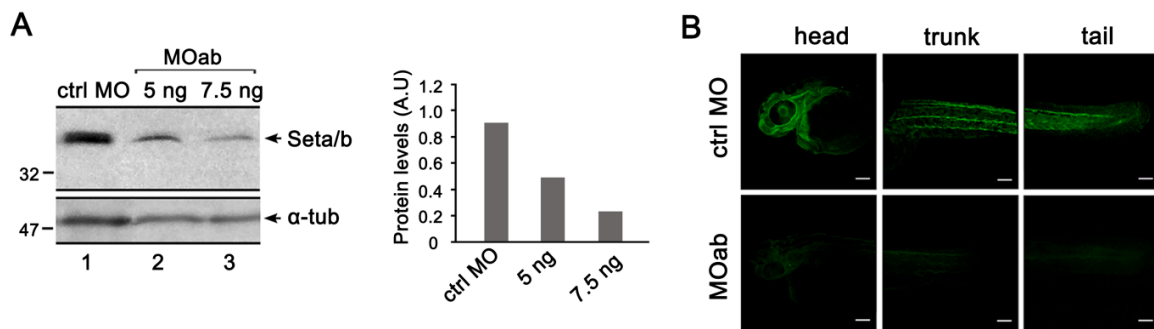
Οι συγκεκριμένες δομικές τροποποιήσεις παρέχουν στα MO συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων τύπων αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η σταθερότητα αυτών των μορίων εντός των βιολογικών συστημάτων όπως και ότι δεν αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες ή άλλα μακρομόρια περιορίζοντας έτσι τις παρενέργειες λόγω μη-ειδικής δράσης. Καθοριστικής σημασίας για τη χρήση τους είναι και η αυξημένη διαλυτότητα που παρουσιάζουν σε υδατικά διαλύματα καθώς διευκολύνει τη διάχυσή τους εντός του αναπτυσσόμενου εμβρύου (Summerton J. and Weller, 1997; Summerton J. E., 2007).

## **Έλεγχος αποτελεσματικότητας και εξειδίκευσης των αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προκειμένου να μελετηθεί ο λειτουργικός ρόλος των γονιδίων *seta/b* στην ανάπτυξη του zebrafish χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά αντινοσηματικά ολιγομερή τα οποία διαφέρουν ως προς τον μηχανισμό δράσης τους. Αρχικά σχεδιάστηκε ένα ολιγομερές το οποίο παρεμποδίζει την έναρξη της μετάφρασης (translation blocking MO) αφού συνδεθεί συμπληρωματικά στην αλληλουχία του ώριμου mRNA. Η αλληλουχία του MO επιλέχθηκε έτσι ώστε να υβριδίζει με την περιοχή κοντά στο κωδικόνιο έναρξης (ATG), όπου τα δύο μετάγραφα είναι όμοια, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ταυτόχρονη στόχευσή τους (MOab). Απαραίτητο βήμα πριν την συστηματική χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων για την κατανόηση της λειτουργικής συμπεριφοράς των υπό μελέτη γονιδίων ήταν ο διεξοδικός έλεγχος της αποτελεσματικής και εξειδικευμένης δράσης τους.

### **Στόχευση μέσω μηχανισμού παρεμπόδισης της μετάφρασης**

Πειραματικά πραγματοποιήθηκε μικροέγχυση αυξανόμενων ποσοτήτων του ολιγομερούς MOab (5 και 7.5 ng) σε έμβρυα zebrafish στο στάδιο 1-2 κυττάρων και μέσω ανοσοαποτύπωσης Western με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος (anti-I2PP2A, Παράρτημα 2, Εικόνα 1B,Δ) διαπιστώθηκε δόσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών *Seta/b* υποδεικνύοντας την αποτελεσματική δράση του MOab (Εικόνα 4.7A). Η αποτελεσματικότητα του MOab επιβεβαιώθηκε και *in vivo* μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού με τη χρήση του αντισώματος anti-Set. Η χρώση έγινε σε έμβρυα σταδίου 48 hpf, μετά από μικροέγχυση του MOab ή ενός μη-ειδικού ολιγομερούς (control MO). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7B, η ένταση του φθορισμού στην περίπτωση των morphants (MOab) είναι σημαντικά μικρότερη της αντίστοιχης των εμβρύων ελέγχου (ctrl MO) και η μείωση αυτή παρατηρείται σε ολόκληρο το σώμα των εμβρύων.



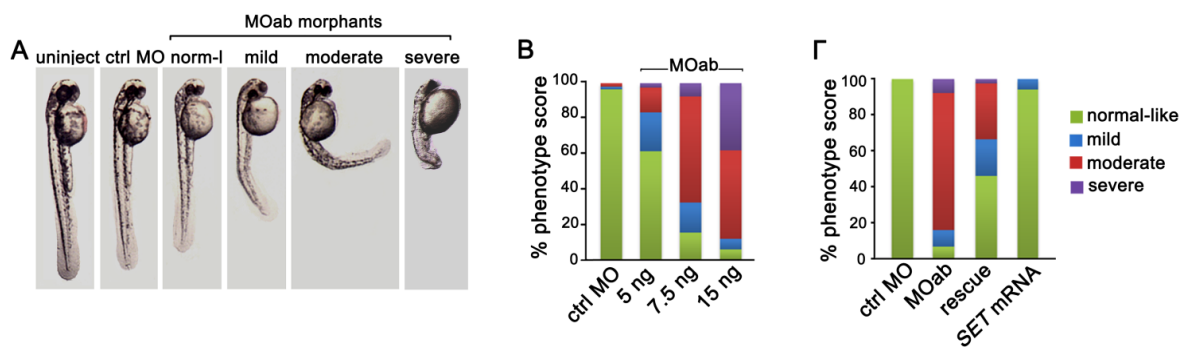
**Εικόνα 4.7. Ανάλυση αποτελεσματικότητας του MOab.** (A) Δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων έκφρασης των *Seta/b*. Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων των *Seta/b* σε εκχυλίσματα εμβρύων 48 hpf, μετά από έγχυση μη ειδικού MO (ctrl MO) και MOab σε ποσότητες 5 και 7.5 ng, μέσω ανοσοαποτύπωσης Western με τη χρήση του αντισώματος anti-I2PP2A. Η ποσοτικοποίηση των εντάσεων των ζωνών έγινε με το πρόγραμμα Quantity One και η κανονικοποίηση των τιμών έγινε σε σχέση με την  $\alpha$ -τουμπουλίνη (ιστόγραμμα). (B) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των *Seta/b* μέσω ανοσοφθορισμού, σε έμβρυα ελέγχου (ctrl MO) και *seta/b* morphants (7.5 ng MOab), στο στάδιο των 48 hpf, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-Set. Η παρατήρηση των εμβρύων έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Γραμμή κλίμακας 100  $\mu$ m.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν οι φαινοτυπικές αλλαγές που ανέπτυσαν τα morphants ως συνέπεια της μείωσης έκφρασης των *seta/b*. Η παρατήρηση των εμβρύων έγινε στο στάδιο των 48 hpf καθώς σε αυτή τη φάση της ανάπτυξης έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της μορφογένεσης και της οργανογένεσης. Από την καταγραφή των μορφολογικών διαφορών προέκυψε ότι τα *seta/b* morphants (7.5 ng MOab), παρουσίαζαν βραδύτερους ρυθμούς ανάπτυξης οι οποίοι συνοδευόταν από μείωση στο μέγεθος/μήκος του σώματός τους και του κεφαλιού. Συγκεκριμένα στο κεφάλι, χαρακτηριστική ήταν η επίδραση στο σχηματισμό των οφθαλμών, οι οποίοι ήταν σαφώς μικρότεροι και παραμορφωμένοι. Όσον αφορά το υπόλοιπο σώμα, τόσο ο κορμός όσο και η ουρά εμφάνισαν κάμψη και αναδίπλωση προς την περιοχή της λεκίθου. Χρησιμοποιώντας ως κριτήριο τις προαναφερθείσες διαφορές και την ένταση των μορφολογικών παραμορφώσεων, οι παρατηρούμενοι φαινότυποι κατηγοριοποιήθηκαν ως εξής: όμοιος του φυσιολογικού (normal-like), ήπιος (mild), μέτριος (moderate) και δριμύς (severe) (Εικόνα 4.8A). Επόμενο βήμα ήταν η ανάλυση της επίδρασης αυξανόμενων δόσεων MOab (5, 7.5 και 15 ng) στην ανάπτυξη των παραπάνω φαινοτύπων. Όπως είναι εμφανές από το ιστόγραμμα (Εικόνα 4.8B) η μετακίνηση των υποπληθυσμών προς το δριμύ φαινότυπο είναι αναλογική της αύξησης του εγχυόμενου MOab, εμφανίζοντας ακόμη μια φορά σχέση δοσο-



εξάρτησης. Αντίθετα τα έμβρυα ελέγχου στα οποία έγινε μικροέγχυση μη ειδικού MO, δεν εμφάνισαν καμία αξιοσημείωτη αλλαγή ακόμα και στην ποσότητα των 15 ng, αποδεικνύοντας και σε αυτήν την περίπτωση την ειδική δράση του MOab.

Περαιτέρω έλεγχος της ειδικότητας του MOab έγινε μέσω διεξαγωγής πειραμάτων διάσωσης φαινοτύπου, χρησιμοποιώντας mRNA του ανθρώπινου γονιδίου *SET*. Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο δείγμα γιατί σε επίπεδο μεταγράφου εμφανίζει διαφορές με τα ορθόλογα γονίδια του zebrafish. Οι διαφορές αυτές αποτρέπουν τον υβριδισμό του MOab στο ανθρώπινο *SET* mRNA, επιτρέποντας τη σύνθεση της πρωτεΐνης SET η οποία λόγω ομοιότητας με τις Seta/b θα μπορούσε να δράσει αντισταθμιστικά στη μείωση των τελευταίων. Πράγματι, η ταυτόχρονη έγχυση 7.5 ng MOab και 70 pg *SET* mRNA σε έμβρυα zebrafish στο στάδιο του ζυγωτού, οδήγησε σε μερική ανάκτηση φαινοτύπου όπως φαίνεται και από τη μετατόπιση των ποσοστών προς ήπιο ή σχεδόν φυσιολογικό φαινότυπο σε σχέση με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την έγχυση 7.5 ng MOab (Εικόνα 4.8Γ). Μέσω αυτού, αποδεικνύεται ξανά πως οι φαινοτυπικές αλλαγές που εμφανίζουν τα morphants οφείλονται στην ειδική στόχευση του MOab έναντι των δύο μεταγράφων.

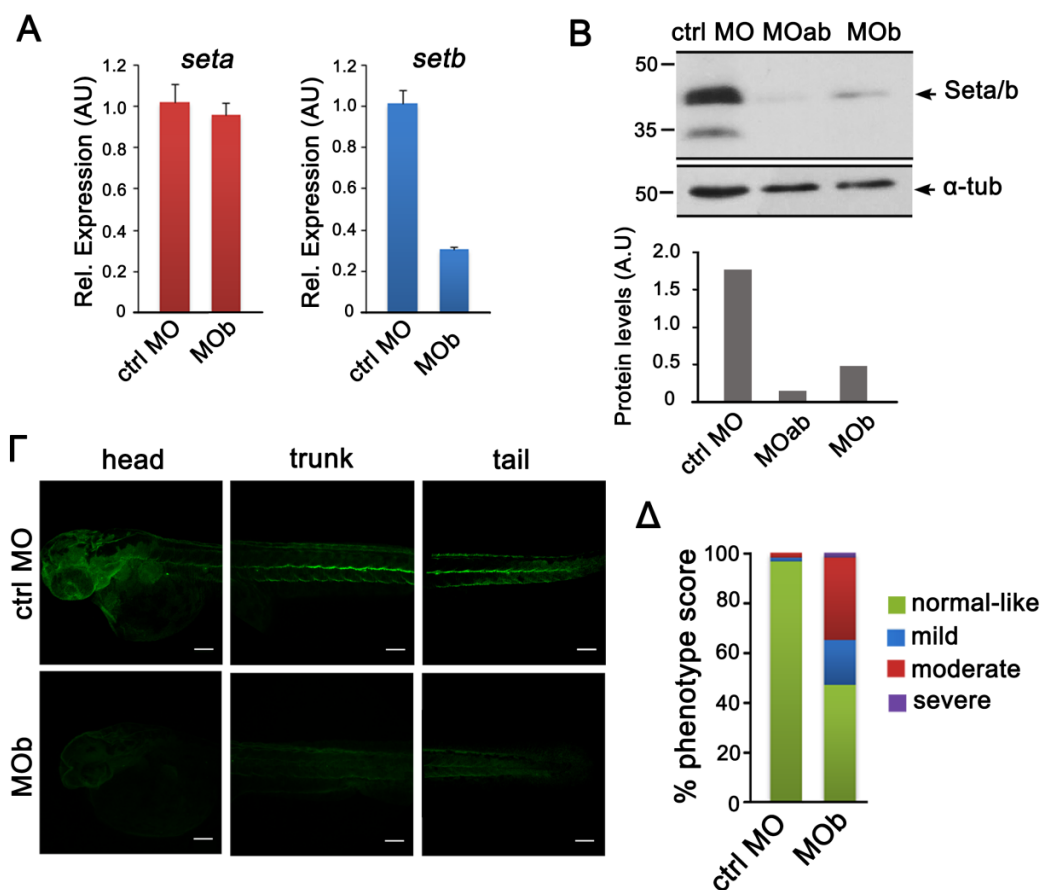


**Εικόνα 4.8. Φαινοτυπική ανάλυση και έλεγχος ειδικότητας του MOab.** (Α) Μορφολογικά χαρακτηριστικά των MOab morphants. Απεικονίζονται έμβρυα 48 hpf μετά από μικροέγχυση 7.5 ng MOab στο στάδιο 1-2 κυττάρων. Με βάση τον βαθμό παραμόρφωσης, ο φαινότυπος των morphants, χαρακτηρίστηκε ως όμοιος του φυσιολογικού (norm-I), ήπιος (mild), μέτριος (moderate) και δριμύς (severe). (Β) Καταγραφή φαινοτύπων ως απόκριση διαβάθμισης συγκέντρωσης του MOab. Καταμέτρηση των ποσοστών των morphants (48 hpf) βάσει του φαινοτύπου τους (Γ) μετά από μικροέγχυση control MO (n=609, N=6), 5 ng MOab (n=341, N=3), 7.5 ng MOab (n=644, N=4) και 15 ng Moab (n=149, N=2). Όπου n είναι συνολικός αριθμός των εμβρύων που αξιολογήθηκαν για τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά και N είναι ο αριθμός των ανεξάρτητων πειραμάτων. (Γ) Διάσωση φαινοτύπου. Καταμέτρηση των φαινοτύπων που ανέπτυξαν έμβρυα 48 hpf, μετά από μικροέγχυση control MO, 7.5 ng MOab, 7.5 ng MOab μαζί με 70 pg *SET* mRNA (rescue) και *SET* mRNA (70 pg).

### **Στόχευση μέσω μηχανισμού παρεμπόδισης της διαδικασίας ματίσματος**

Επιπλέον του MOab, χρησιμοποιήθηκε και ένα δεύτερο αντινοσηματικό ολιγομερές το οποίο διαφέρει ως προς τον τρόπο δράσης του καθώς παρεμβαίνει στη διαδικασία του ματίσματος του πρόδρομου mRNA. Ο σχεδιασμός του έγινε με βάση την αλληλουχία του *setb* μεταγράφου (MOb) ώστε να υβριδίζει με την περιοχή σύνδεσης εξωνίου 3/ιντρονίου 3 (E3/I3).

Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (Παράρτημα 4, Πίνακας 2), έγινε ανάλυση των επιπέδων mRNA των *seta* και *setb* με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Όπως αναμενόταν, σημαντική μείωση ανιχνεύθηκε μόνο στην περίπτωση του *setb* mRNA ενώ τα επίπεδα του *seta* παρέμειναν ανεπηρέαστα (Εικόνα 4.9Α). Παρότι τα δύο ολιγομερή διαφέρουν ως προς τον μηχανισμό τους, απώτερος στόχος της χρήσης τους ήταν η μείωση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Πραγματοποιήθηκε επομένως συγκριτική ανάλυση της απόδοσης των MOab και MOb μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, όπου διαπιστώθηκε ότι στην περίπτωση των εμβρύων που είχε γίνει μικροέγχυση με MOb (7.5 ng) τα επίπεδα των πρωτεϊνών Seta/b παρουσίαζαν μικρότερη μείωση σε σχέση με τα αντίστοιχα των MOab morphants. Το εν λόγω αποτέλεσμα ήταν και το προσδοκώμενο εφόσον το MOb στοχεύει μόνο το mRNA του *setb*, με το αντίστοιχο *seta* να εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Ωστόσο όπως διακρίνεται και από την κανονικοποίηση των εντάσεων των ζωνών (Εικόνα 4.9Β), το ποσοστό μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων είναι αρκετά υψηλό και συγκρίσιμο με το MOab υποδεικνύοντας ότι το *setb* είναι το γονίδιο που εκφράζεται πιο έντονα στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο. Η διαφορά στο βαθμό μείωσης των επιπέδων έκφρασης των *seta/b* ήταν εμφανής και μετά από χρώση των MOb morphants με το αντίσωμα anti-Set (Εικόνα 4.9Γ). Τέλος, όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων εμβρύων, παρατηρήθηκαν παρόμοιες παραμορφώσεις τόσο στο κεφάλι όσο και στην ουρά, με τα μεγαλύτερα ποσοστά των morphants να εντάσσονται στις κατηγορίες του ήπιου και μέτριου φαινότυπου (Εικόνα 4.9Δ). Από τα παραπάνω προκύπτει πως και τα δύο αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα καταστολής έκφρασης, εμφανίζουν ειδική δράση ως προς τον στόχο τους.



**Εικόνα 4.9.** Ανάλυση αποτελεσματικότητας και ειδικής δράσης του MOb. (A) Ανάλυση των επιπέδων των *seta* και *setb* μεταγράφων με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) χρησιμοποιώντας RNA το οποίο απομονώθηκε από έμβρυα ελέγχου (ctrl MO) και MOb morphants (7.5 ng MOb), στο στάδιο των 48 hpf. (B) Σύγκριση αποτελεσματικότητας MOab και MOb. Συλλέχθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από έμβρυα 48 hpf μετά από μικροέγχυση control MO, 7.5 ng MOab και 7.5 ng MOb. Τα επίπεδα έκφρασης αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-I2PP2A. Η  $\alpha$ -τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των εντάσεων των ζωνών έγινε με το Quantity One. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε σε σχέση με την  $\alpha$ -τουμπουλίνη (ιστόγραμμα). (Gamma) Ανοσολογική χρώση εμβρύων ελέγχου (ctrl MO) και MOb morphants (7.5 ng) στο στάδιο των 48 hpf, με τη χρήση του αντισώματος anti-Set. Γραμμή κλίμακας 100  $\mu$ m. (Delta) Καταμέτρηση και κατηγοριοποίηση των εμβρύων βάσει του φαινότυπου τους. Η καταγραφή του φαινότυπου έγινε στις 48 hpf μετά από μικροέγχυση control MO (n=609, N=6) και 7.5 ng MOb (n=976, N=6), όπου n είναι ο συνολικός αριθμός των εμβρύων που αξιολογήθηκαν και N είναι ο αριθμός των ανεξάρτητων πειραμάτων.

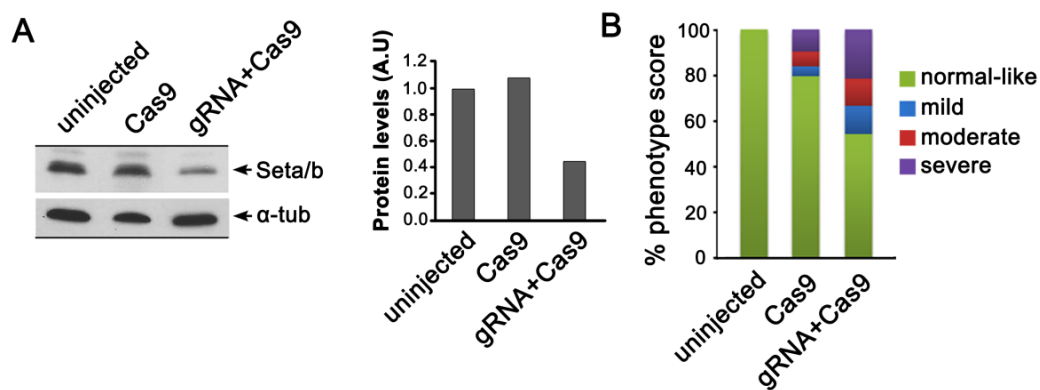
#### 4.5.2. Καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *setb* μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9

Με απώτερο στόχο τη μελέτη των λειτουργικών συνεπειών που θα προέκυπταν από τη μειωμένη έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων, χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά της μεθόδου των αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης, το σύστημα CRISPR-Cas9. Μέσω της συγκεκριμένης προσέγγισης υπάρχει η δυνατότητα στόχευσης ενός γονιδίου σε επίπεδο DNA και η επακόλουθη αντιπαραβολή των προκαλούμενων φαινοτυπικών διαταραχών με τις αντίστοιχες που προήλθαν από τη στρατηγική των MO.

##### *Στοχευμένη δράση του συστήματος CRISPR-Cas9 έναντι της έκφρασης του γονιδίου setb*

Όπως περιγράφηκε στα παραπάνω αποτελέσματα, από τη σύγκριση της επίδρασης των MOab και MOb στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb*, διαπιστώθηκε πως κυρίαρχο γονίδιο στο στάδιο των 48 hpf, είναι το *setb* (Εικόνα 4.9B). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η ειδική δράση των MO, επιλέχθηκε η αλληλουχία στόχευσης έναντι του γονιδίου *setb* και συγκεκριμένα εντός του πρώτου εξωνίου του, και έπειτα σχεδιάστηκε το αντίστοιχο μόριο gRNA. Πραγματοποιήθηκε μικροέγχυση του gRNA σε συνδυασμό με το *in vitro* συντεθειμένο mRNA της νουκλεάσης Cas9 σε έμβρυα στο στάδιο του ενός κυττάρου. Τα έμβρυα αφήθηκαν να αναπτυχθούν και στις 48 hpf ελέγχθηκε η αποτελεσματική στόχευση του gRNA και αντίστοιχα η ειδική δράση του ενζύμου αναφορικά με τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του *setb*. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.10A η έκφραση του γονιδίου είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με τα φυσιολογικά ανιχνεύσιμα επίπεδα, όπως αυτά διακρίνονται στην περίπτωση των μη ενεθέντων εμβρύων ή αυτών στα οποία είχε εγχυθεί μόνο το mRNA του ενζύμου Cas9. Συγκεκριμένα με βάση την ποσοτικοποίηση των ζωνών (Εικόνα 4.10A, ιστόγραμμα), διαπιστώνεται πως η μείωση αυτή ανέρχεται σε ποσοστό 60%. Να αναφερθεί πως και σε αυτή την περίπτωση, αντίστοιχα με το MOb, δεν επηρεάζεται η έκφραση του *seta*.

Επιπλέον, στο ίδιο στάδιο (48 hpf) τα έμβρυα αξιολογήθηκαν ως προς τη μορφολογία τους και βάσει των φαινοτυπικών αλλαγών ομαδοποιήθηκαν στις κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Από την καταγραφή προέκυψε ότι η κατανομή των φαινοτυπικών υποπληθυσμών είναι παρόμοια με αυτήν των MOb morphants και πιο ήπια από την αντίστοιχη των MOab morphants (Εικόνα 4.10B).



**Εικόνα 4.10. Ανάλυση δράσης του *setb* gRNA/Cas9.** (A) Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων μέσω ανοσοαποτύπωσης Western σε κυτταρικά εκχυλίσματα που είχαν ληφθεί από έμβρυα 48 hpf στα οποία είχε γίνει μικροέγχυση 150 ng/μl *Cas9* mRNA ή 50 ng/μl *setb* gRNA +150 ng/μl *Cas9* mRNA. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα εμβρύων στα οποία δεν εγχύθηκε καμία ουσία. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-I2PP2A. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών έγινε με το Quantity One και η κανονικοποίηση έγινε σε σχέση με την  $\alpha$ -τουμπουλίνη. (B) Καταγραφή φαινοτύπων. Η καταμέτρηση των εμβρύων έγινε στις 48 hpf μετά από μικροέγχυση 150 ng/μl *Cas9* mRNA (n=74, N=3) ή 50 ng/μl *setb* gRNA +150 ng/μl *Cas9* mRNA (n=259, N=6). Ως επιπλέον δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν μη ενεθέντα έμβρυα (n=120, N=6). Η διάκριση των φαινοτύπων έγινε με βάση τον τύπο και την ένταση των μορφολογικών τους αλλαγών.

#### 4.5.3. Μελέτη της επίδρασης της καταστολής έκφρασης των πρωτεϊνών *Seta/b* στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση

##### *Κυτταρικός πολλαπλασιασμός*

Η σχέση της ανθρώπινης πρωτεΐνης SET με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου έχει δειχθεί σε αρκετές έρευνες και αποδίδεται στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με συγκεκριμένα μόρια. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η σύνδεση της SET με τις κυκλίνες B (Kellogg *et al.*, 1995) και με τον αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21<sup>Cip1</sup> (Estanyol *et al.*, 1999), όπως και ειδικότερα στο νευρικό σύστημα με την κυκλίνη p35<sup>ncK5a</sup> που δρα ως ενεργοποιητής της Cdk5 (Qu *et al.*, 2002).

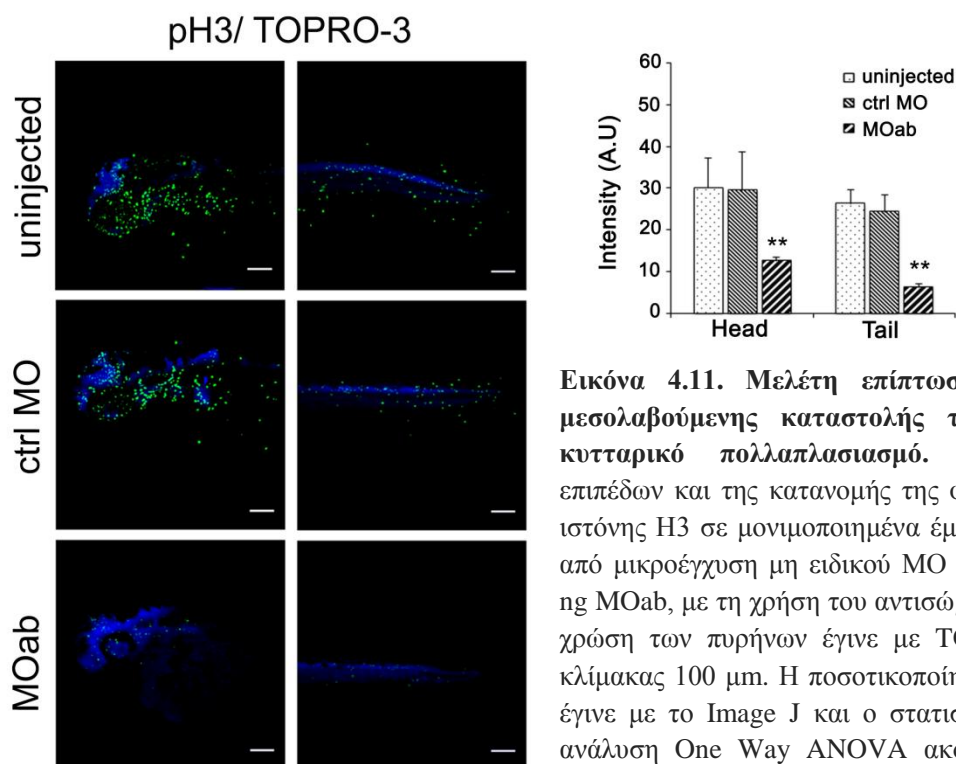
Συγκεκριμένα, όσον αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, είναι γνωστό ότι μέσω των παραπάνω αλληλεπιδράσεων η SET επηρεάζει τη μετάβαση από τη φάση G2 στη Μίτωση (Canela *et al.*, 2003). Σε αυτή τη δράση συνηγορεί και ο ρόλος της SET ως αναστολέας της PP2A, καθώς είναι γνωστό ότι η τελευταία κατά τη G2/M, διατηρεί το σύμπλοκο B/CDK1 (ή MPF) ανενεργό (Perrotti and Neviani, 2013). Επομένως η αναστολή της PP2A από τη SET επιτρέπει τη φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση του συμπλόκου οδηγώντας το κύτταρο στη διαίρεση.

Με βάση τα παραπάνω, ελέγχθηκε κατά πόσον η παρεμπόδιση της έκφρασης των γονιδίων *seta/b* θα είχε αντίκτυπο στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε επίπεδο οργανισμού. Στα πλαίσια αυτά χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα zebrafish στα οποία είχε γίνει μικροέγχυση αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων MOab. Η συλλογή και μονιμοποίηση των εμβρύων έγινε στις 48 hpf, ενώ η επιλογή έγινε με βάση την ανάπτυξη του μέτριου φαινότυπου. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη ιστόνη H3 (anti-pH3). Η εν λόγω μετα-μεταφραστική τροποποίηση στη Ser10 συνδέεται με τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων κατά τη λήξη της φάσης G2 και την έναρξη της Μίτωσης, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Η σήμανση των πυρήνων έγινε με το TOPRO-3.

Από την παρατήρηση των εμβρύων στην Εικόνα 4.11, είναι εμφανές πως τόσο στα έμβρυα που δεν είχαν υποστεί καμία επεξεργασία (uninjected) όσο και στα έμβρυα ελέγχου (ctrl MO) τα επίπεδα κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι αρκετά υψηλά όπως θα ανάμενε κανείς δεδομένου του αναπτυξιακού σταδίου που εξετάζεται. Ακόμη, αισθητή είναι η διαφορά μεταξύ του αριθμού των εστιών πολλαπλασιασμού στην περιοχή του

κεφαλιού σε σχέση με αυτή του κορμού, όπου κυρίως εντοπίζονται προς το άκρο της ουράς. Η διαφορά αυτή οφείλεται αφενός στο μεγαλύτερο μέγεθος της μία περιοχής του σώματος σε σχέση με τη άλλη και αφετέρου στο ότι στο κεφάλι διατηρούνται οι γρήγοροι ρυθμοί ανάπτυξης και αύξησης τόσο του εγκεφάλου όσο και των αισθητήριων οργάνων ώστε μετά την εκκόλαψη ο οργανισμός να μπορεί να ανταποκριθεί σε κάθε ερέθισμα του περιβάλλοντος. Παράλληλα το άκρο της ουράς λειτουργεί ως ζώνη επέκτασης του σώματος ενώ χαρακτηρίζεται ως περιοχή με αυξημένη αναγεννητική ικανότητα.

Στην περίπτωση των MOab morphants, διαπιστώνεται σημαντική μείωση των επιπέδων πολλαπλασιασμού. Η μείωση αυτή είναι ορατή σε όλη την έκταση του σώματος τους και αφορά τόσο τον αριθμό των ανιχνυόμενων εστιών όσο και την ένταση του φθορισμού τους (Εικόνα 4.11, ιστόγραμμα).



**Εικόνα 4.11. Μελέτη επίπτωσης της MOab-μεσολαβούμενης καταστολής των *seta/b* στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.** Ανίχνευση των επιπέδων και της κατανομής της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H3 σε μονιμοποιημένα έμβρυα 48 hpf μετά από μικροέγχυση μη ειδικού MO (ctrl MO) και 7.5 ng MOab, με τη χρήση του αντισώματος anti-pH3. Η χρώση των πυρήνων έγινε με TOPRO-3. Γραμμή κλίμακας 100 μm. Η ποσοτικοποίηση των εντάσεων έγινε με το Image J και ο στατιστικός έλεγχος με ανάλυση One Way ANOVA ακολουθούμενη από *post-hoc* test πολλαπλών συγκρίσεων. \*\*  $p < 0.05$

Συμπερασματικά αποδεικνύεται η συσχέτιση της μειωμένης έκφρασης, άρα και δράσης των πρωτεϊνών *Seta/b* με την περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων των morphants. Η ανίχνευση χαμηλών επιπέδων φωσφορυλιωμένης ιστόνης H3 υποδεικνύει τη στάση των κυττάρων στη φάση G2.

## Απόπτωση

Πέραν της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, η SET εμπλέκεται και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Χαρακτηριστική είναι η δράση της SET ως μέλος του ομώνυμου συμπλόκου της στην απόπτωση μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου των κασπασών, ο οποίος ενεργοποιείται κατά την ανοσοαπόκριση από το GzmA (Beresford *et al.*, 2001; Chakravarti and Hong, 2003; Martinvalet *et al.*, 2005). Ακόμη, ενεργός φαίνεται πως είναι ο ρόλος της SET σε συνθήκες οξειδωτικού stress όπου προωθεί τον κυτταρικό θάνατο είτε μέσω παρεμπόδισης της ακετυλίωσης του παράγοντα FoxO1 οδηγώντας στη μεταγραφή του *p21* ή επηρεάζοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των Akt και PTEN μέσω της PP2A (Chae *et al.*, 2014; Leopoldino *et al.*, 2012). Παράλληλα έχει δειχθεί ότι συμμετέχει και στην απόπτωση μέσω κασπασών όπου βρέθηκε ότι πρωτεολύεται τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* από την κασπάση 7 (Morita *et al.*, 2000).

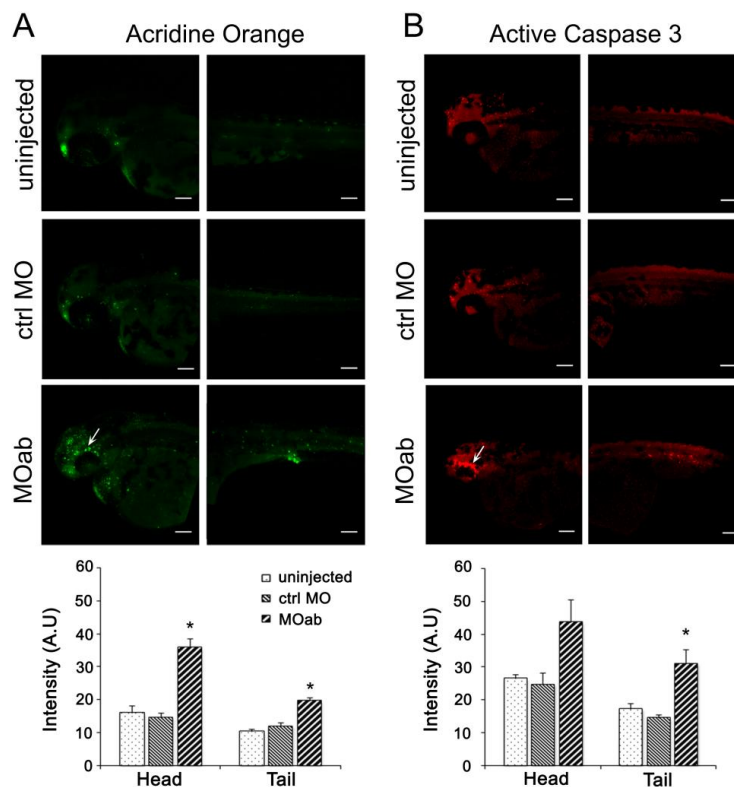
Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, επόμενο στόχο αποτέλεσε η διερεύνηση των επιπτώσεων της καταστολής των Seta/b στα επίπεδα απόπτωσης των εμβρύων, αξιοποιώντας δύο μεθόδους μελέτης κυτταρικού θανάτου: μέσω *in vivo* χρώσης με τη φοριζουσα χρωστική Acridine Orange η οποία προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα των πυκνωτικών πυρήνων, κυττάρων που αποπίπτουν και μέσω ανοσοφθορισμού με τη χρήση του αντισώματος που αναγνωρίζει την ενεργοποιημένη μορφή της κασπάσης 3 (anti-active caspase 3).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν και από τις δύο μεθόδους, η καταστολή των Seta/b συνδέεται με σημαντική αύξηση των εστιών απόπτωσης τόσο στο κεφάλι όσο και στην ουρά των MOab morphants. Διακριτό είναι το πρότυπο ανίχνευσης των εστιών απόπτωσης περιφερειακά των οφθαλμών, το οποίο είναι εξίσου εμφανές και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνα 4.12A,B βέλη). Όσον αφορά την ουρά, οι δύο χρώσεις αποκαλύπτουν σχετικά διαφορετικό πρότυπο απόπτωσης καθώς στην περίπτωση της χρώσης με Acridine Orange οι εστίες έχουν σποραδική κατανομή ενώ αυξημένος φθορισμός εντοπίζεται στην περιοχή της ουρογεννητικής οπής. Ο έντονος φθορισμός που παρατηρείται στην περιοχή της οσφρητικής κοιλότητας των μη ενεθέντων εμβρύων και των εμβρύων ελέγχου, πιθανά οφείλεται σε τυχαία δέσμευση της χρωστικής (Εικόνα 4.12A). Αντίθετα στην περίπτωση της χρώσης της κασπάσης 3, οι εστίες είναι κατανεμημένες κεντρικά, κατά μήκος του σώματος ακολουθώντας τη διαδρομή του νεύρου της πλευρικής γραμμής χωρίς ωστόσο να αποδεικνύεται κάποια σύνδεση με αυτό



(Εικόνα 4.12B). Οι διαφορές των εντάσεων φθορισμού μεταξύ των δειγμάτων, έχουν ποσοτικοποιηθεί και απεικονίζονται στα αντίστοιχα ιστογράμματα.

Συνδυαστικά, από τη μελέτη της επίδρασης της καταστολής της έκφρασης των *seta/b* στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, επιβεβαιώθηκε πως και στην περίπτωση του zebrafish διατηρείται η λειτουργική σχέση μεταξύ των ορθόλογων πρωτεϊνών της SET και των εν λόγω διαδικασιών. Η ταυτόχρονη μείωση του πολλαπλασιασμού και αύξηση της απόπτωσης απουσία των *Seta/b*, σε θέσεις όπου ανιχνεύονται φυσιολογικά οι πρωτεΐνες (Εικόνα 4.4), υποστηρίζει την πιθανή δράση τους στην ανάπτυξη των αντίστοιχων περιοχών.

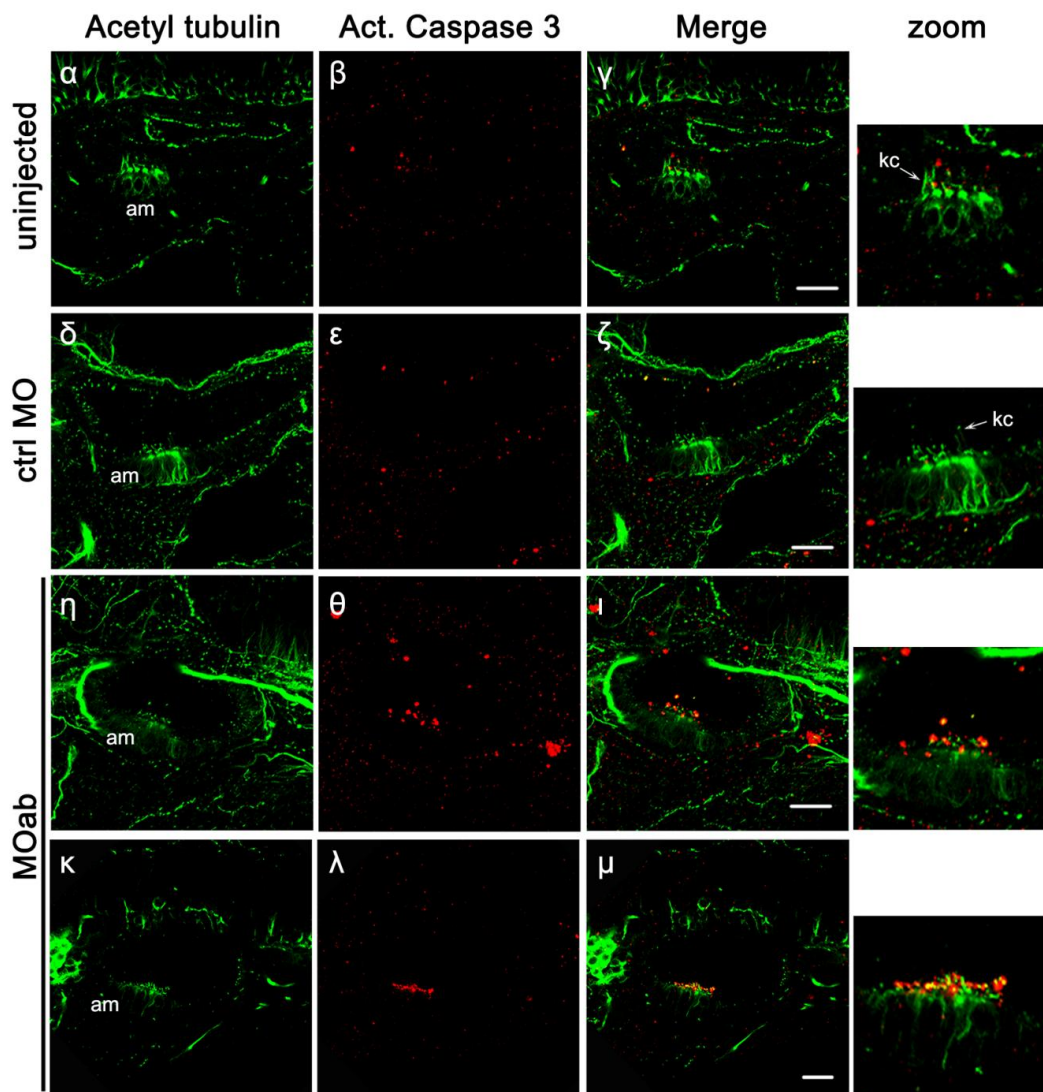


**Εικόνα 4.12. Μελέτη επίπτωσης της MOab-μεσολαβούμενης καταστολής των *seta/b* στην κυτταρική απόπτωση. (A) *In vivo* σήμανση εστιών απόπτωσης αναισθητοποιημένων εμβρύων ελέγχου και MOab morphants με τη φθορίζουσα χρωστική Acridine Orange. (B) Ανίχνευση των επιπέδων και της κατανομής της ενεργής κασπάσης 3 σε μονιμοποιημένα έμβρυα zebrafish 48 hpf μετά από μικροέγχυση μη ειδικού MO (ctrl MO) και 7.5 ng MOab, μέσω ανοσοφθορισμού με το αντίσωμα anti-active caspase-3. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου. Γραμμή κλίμακας 100  $\mu$ m. Η μέτρηση και η ποσοτικοποίηση των εντάσεων των φθορισμών έγινε μετά από τον ορισμό συγκεκριμένων περιοχών (ROI) στο κεφάλι και την ουρά των εμβρύων όλων των δειγμάτων, με τη χρήση του προγράμματος Image J. Τα αποτελέσματα παρατίθενται ως μέση τιμή $\pm$ σφάλμα μέσης τιμής τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Ο έλεγχος στατιστικά σημαντικών διαφορών έγινε μέσω ανάλυσης διακυμάνσεων One Way ANOVA, ακολουθούμενη από *post hoc* ανάλυση πολλαπλών συγκρίσεων (Tukey's test), θεωρώντας ως σημαντική τη διαφορά όταν  $p < 0.05$  (\*) και  $p < 0.01$  (\*\*).**

#### 4.5.4. Μελέτη της επίδρασης της καταστολής των *seta/b* στο έσω ους

Η έκφραση των *seta/b* στο ωτικό κυστίδιο/ έσω ους του zebrafish και ειδικότερα στις τρεις ακρολοφίες έχει δειχθεί τόσο σε επίπεδο κατανομής μεταγράφων (Εικόνα 4.3K,M) όσο και πρωτεϊνών (Εικόνα 4.4B,α), ενώ η κατανομή τους στις αισθητήριες κηλίδες, έχει δειχθεί μόνο σε επίπεδο mRNA (Παράρτημα 3, Εικόνα 3A). Διερευνήθηκε επομένως η επίδραση της παρεμπόδισης της έκφρασης των *seta/b* στα ακουστικά όργανα του zebrafish.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα επίπεδα απόπτωσης σε έμβρυα 48 hpf μετά από μικροέγχυση αντινοηματικών ολιγονουκλεοτιδίων MOab, χρησιμοποιώντας ως δείκτη των νευρικών κυττάρων το αντίσωμα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης. Από την παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση των εστιών απόπτωσης στα ωτικά κυστίδια των morphants (Εικόνα 4.13η-μ, zoom) σε σχέση με τα έμβρυα ελέγχου (Εικόνα 4.13α-ζ, zoom). Η συσσώρευση αυτή εντοπίζεται στην περιοχή της εμπρόσθιας κηλίδας (am) και ειδικότερα στην κορυφαία πλευρά των αισθητήριων κυττάρων όπου προεκβάλλουν οι κροσσοί (kc). Στην περιοχή αυτή των κροσσών είναι προσδεδμεμένος ο μικρότερος σε μέγεθος ωτόλιθος. Δεν είναι γνωστό στο συγκεκριμένο στάδιο, εάν αντίστοιχη αύξηση στην απόπτωση συμβαίνει και στα κροσσωτά κύτταρα των ακρολοφιών καθώς η ανάπτυξη των ημικυκλικών καναλιών εντός των οποίων βρίσκονται αυτές οι δομές, ξεκινά στις 45 hpf και ολοκληρώνεται περίπου στις 60 hpf.



**Εικόνα 4.13. Μελέτη απόπτωσης στο ωτικό κυστίδιο των MOab morphants.** Διπλός ανοσοφθορισμός εμβρύων zebrafish στο στάδιο των 48 hpf, χωρίς να έχουν υποστεί επεξεργασία (α-γ) μετά από μικροέγχυση control MO (δ-ζ) ή 7.5 ng MOab (η-μ), χρησιμοποιώντας το αντίσωμα της ενεργής κασπάσης 3 και το αντίσωμα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης. Γραμμή κλίμακας 20 μm. am: εμπρόσθια ακρολοφία, kc: κινητός κροσσός

#### 4.5.5. Μελέτη της επίδρασης της καταστολής έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb* στους νευρομαστούς της πλευρικής γραμμής

Η ανάλυση του προτύπου έκφρασης των *Seta/b* σε έμβρυα και προνύμφες zebrafish, ανέδειξε την παρουσία αυξημένων επιπέδων των πρωτεϊνών στο σύστημα της πλευρικής γραμμής (Εικόνα 4.4). Περαιτέρω χαρακτηρισμός αυτού του εντοπισμού αποκάλυψε την κατανομή τους στα κροσσωτά κύτταρα των νευρομαστών (Εικόνα 4.5) με διακριτή χρώση να εμφανίζεται στους κινητούς και στερεούς κροσσούς (Εικόνα 4.6). Ως εκ τούτου διερευνήθηκε *in vivo* η επίδραση της στοχευμένης μείωσης των επιπέδων των πρωτεϊνών στη λειτουργία των συγκεκριμένων αισθητήριων οργάνων, η οποία επιτελείται μέσω της μηχανοϋποδεκτικής δράσης των κροσσωτών κυττάρων. Για τη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η λιπόφιλη φθορίζουσα χρωστική FM1-43 ως δείκτης μεταγωγής σήματος σε νευρικά κύτταρα.

Μέσω *in vivo* χρώσης με FM1-43, έχει δειχθεί ότι η ανάπτυξη της δεσμίδας των κροσσών γίνεται προοδευτικά και αντανακλά την φάση λειτουργικής ωρίμανσης του κυττάρου (Kindt *et al.*, 2012). Η πρόσληψη της χρωστικής FM1-43 γίνεται μέσω ενδοκυττάρωσης η οποία είναι ταχεία, ανάλογη της κατάστασης ενεργότητας του αισθητήριου κυττάρου και πιθανά μεσολαβείται από ενδοσώματα (Seiler and Nicolson, 1999).

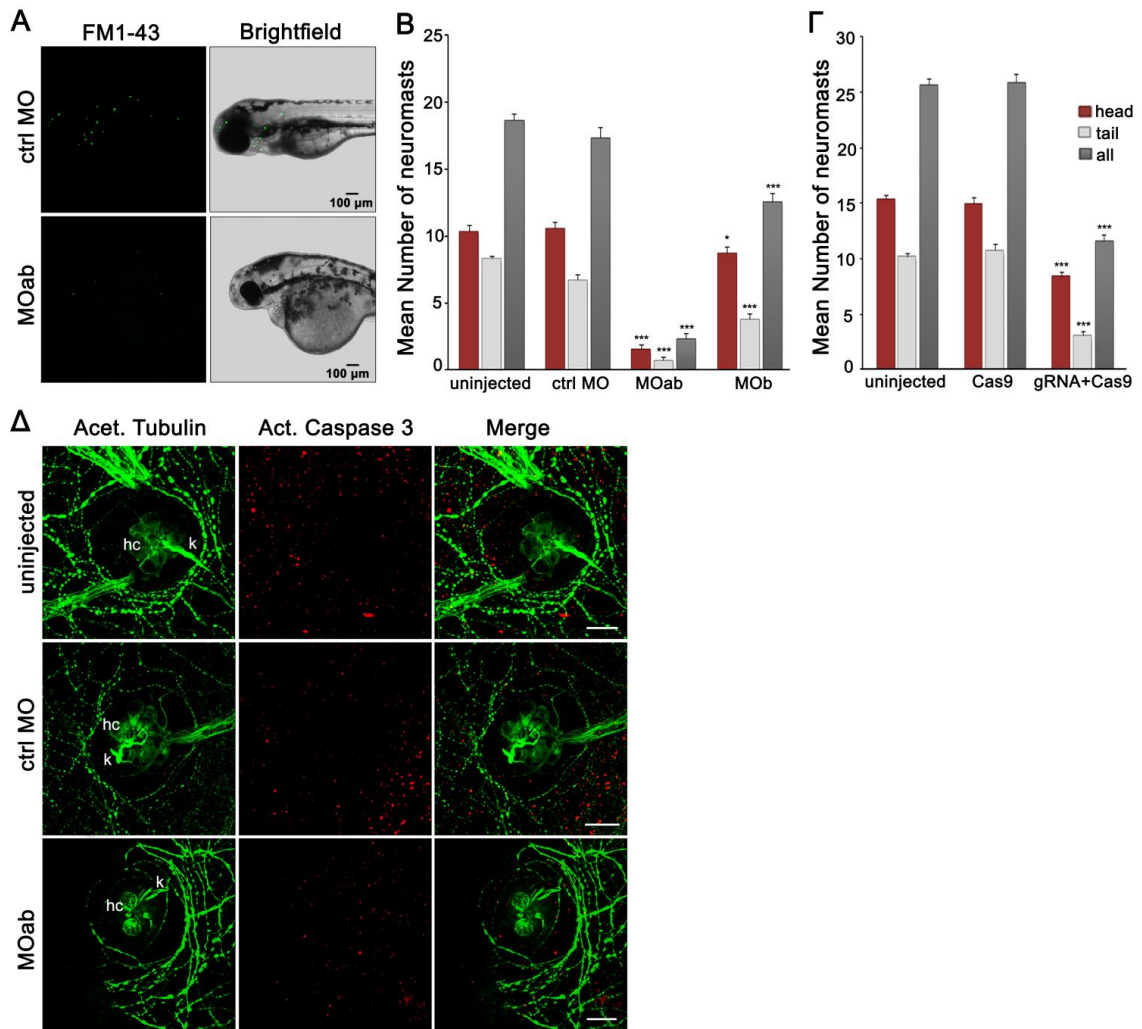
Προκειμένου να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος των *Seta/b* στη λειτουργία των νευρομαστών, πραγματοποιήθηκε *in vivo* χρώση με FM1-43 των νευρομαστών προνυμφών zebrafish, μετά από μικροέγχυση αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων MOab/MOb (4 dpf) ή *setb* gRNA+Cas9 mRNA (7 dpf). Τα συγκεκριμένα στάδια επιλέχθηκαν γιατί η λειτουργική ωρίμανση των κροσσωτών κυττάρων των νευρομαστών ξεκινά μετά τις 2 ημέρες ανάπτυξης. Επομένως η χρήση προνυμφών διευκόλυνε την υλοποίηση του πειράματος και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Επιπλέον, όσον αφορά τα morphants το στάδιο των 4 dpf είναι εντός του χρονικού πλαισίου δράσης των αντινοσηματικών ολιγομερών, όπου μπορούν να αναπτυχθούν και να αξιολογηθούν φαινοτυπικές αλλαγές (Bill *et al.*, 2009).

Η επώαση των προνυμφών με τη χρωστική έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των Μεθόδων (Ενότητα 3.8). Η παρατήρηση των ενεργών νευρομαστών έγινε με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου και η καταμέτρηση αφορούσε τόσο την εμπρόσθια (κεφάλι) όσο και την οπίσθια (ουρά) πλευρική γραμμή, λαμβάνοντας υπόψη μόνο τη μία πλευρά

του σώματος όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.14A. Από την καταγραφή των αποτελεσμάτων, όπως αυτά αποτυπώνονται στο διάγραμμα 4.14B, προκύπτει σαφής πτώση του αριθμού των λειτουργικών νευρομαστών σε όλη την έκταση του σώματος καθώς από 17-18 που ανιχνεύονται στα έμβρυα ελέγχου ο συνολικός αριθμός στα MOb morphants μειώνεται στους 13, ενώ στα MOab morphants στους 3. Η σημαντική αυτή διαφορά αποδεικνύει πως για την αισθητήρια λειτουργία των νευρομαστών είναι απαραίτητη η συνδυαστική δράση των Seta και Setb. Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα και στην περίπτωση των *setb* crispants, όπου διαπιστώθηκε εξίσου σημαντική μείωση των ενεργών νευρομαστών, σχεδόν συγκρίσιμη με των MOb morphants (Εικόνα 4.14Γ, διάγραμμα). Η αύξηση που παρατηρείται στους αριθμούς των μη ενεθέντων προνυμφών και των προνυμφών ελέγχου μεταξύ των δύο διαγραμμάτων είναι ανάλογη του υπό μελέτη αναπτυξιακού σταδίου της κάθε περίπτωσης.

Τέλος, προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσον το παραπάνω αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στην ενεργοποίηση του μηχανισμού απόπτωσης, πραγματοποιήθηκε συνδυαστική χρώση των MOab morphants έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης ως δείκτη του νευρικού συστήματος και της ενεργής κασπάσης-3. Η παρατήρηση των νευρομαστών έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο, χρησιμοποιώντας φακό υψηλής εστίασης ώστε να είναι ευδιάκριτη η μορφολογία τους σε επίπεδο κυττάρου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.14Δ, σε όλες τις περιπτώσεις διακρίνεται η ανάπτυξη των αισθητήριων κροσσωτών κυττάρων (hc) όπως και των αντίστοιχων κινητών κροσσών (k), ωστόσο στην περίπτωση των morphants είναι εμφανής η μείωση του αριθμού των κροσσωτών κυττάρων σε σχέση με τους νευρομαστούς των προνυμφών ελέγχου. Πέραν αυτού όμως δεν εντοπίστηκε αύξηση των επιπέδων κυτταρικού θανάτου κρίνοντας από τη χρώση της ενεργής κασπάσης 3. Επομένως η μείωση των ενεργών νευρομαστών που διαπιστώθηκε από την *in vivo* χρώση με FM1-43, δεν μπορεί να αποδοθεί στην ενεργοποίηση μηχανισμού απόπτωσης.

Βάσει των παραπάνω συμπεραίνεται πως η καταστολή της έκφρασης των *seta/b* επηρεάζει αρνητικά την ενεργότητα των κροσσωτών κυττάρων των νευρομαστών μέσω ενός μηχανισμού διαφορετικού της απόπτωσης, ο οποίος ωστόσο δεν είναι ακόμη γνωστός.



**Εικόνα 4.14. Επίδραση της καταστολής της έκφρασης των *seta/b* στην ανάπτυξη των νευρομαστών. (A)** *In vivo* χρώση των ενεργών νευρομαστών με τη φθορίζουσα χρωστική FM1-43. Αντιπροσωπευτική εικόνα χρώσης FM1-43 σε έμβρυα ελέγχου και MOab morphants στο στάδιο των 4 dpf. **(B)** Γραφική αναπαράσταση του μέσου αριθμού των ενεργών νευρομαστών βάσει της χρώσης FM1-43, σε προνύμφες zebrafish 4 dpf χωρίς να έχουν υποστεί κάποια επεξεργασία (uninjected, n=31) και μετά από μικροέγχυση μη-ειδικού MO (n=36), 7.5 ng MOab (n=33) ή 7.5 ng MOb (n=39). **(Γ)** Γραφική αναπαράσταση του μέσου αριθμού των ενεργών νευρομαστών όπως καταμετρήθηκαν σε προνύμφες zebrafish 7 dpf μετά από μικροέγχυση *Cas9* mRNA (n=20) ή *setb* gRNA+*Cas9* mRNA (n=32) καθώς και σε φυσιολογικές προνύμφες (uninjected, n=42). Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα και n είναι συνολικός αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση. Ο στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων που αποδίδονται ως μέση τιμή±σφάλμα μέσης τιμής, έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS. Η ανάλυση των στατιστικών σημαντικών διαφορών έγινε με One Way ANOVA και *post-hoc* test για πολλαπλές συγκρίσεις. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . **(Δ)** Διπλός ανοσοφθορισμός εμβρύων ελέγχου και MOab morphants στο στάδιο των 48 hpf, με τη χρήση των αντισωμάτων anti-acetylated tubulin και anti-active caspase 3. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε με συνεστικό μικροσκόπιο. Γραμμή κλίμακας 20  $\mu$ m.

## 4.6. Φαρμακολογική αναστολή της δράσης των Seta/b

### 4.6.1. Ανάλυση της επίδρασης του φαρμάκου FTY720, στην πρόιμη ανάπτυξη του zebrafish

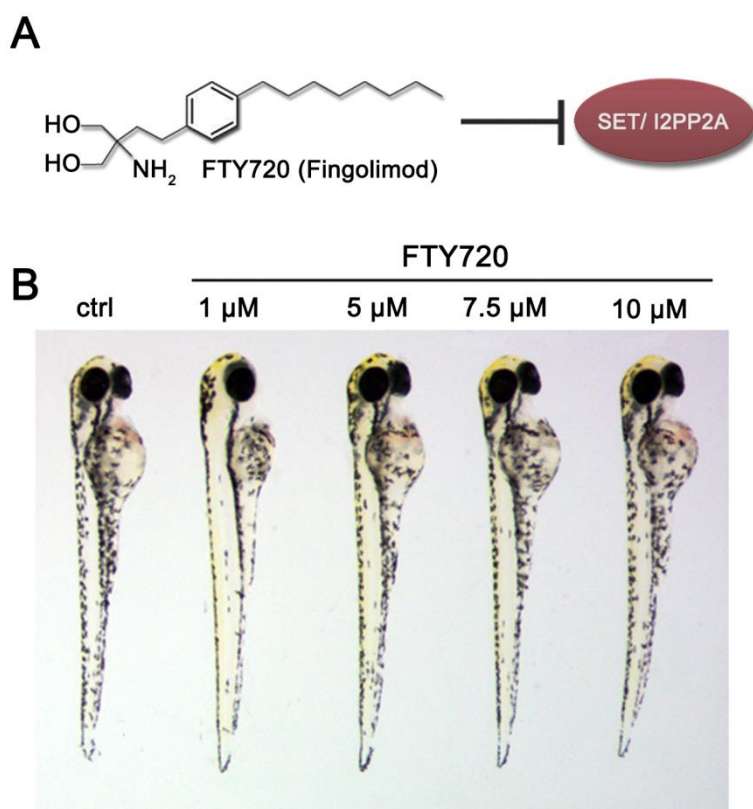
Ο ρόλος των Seta/b στην ανάπτυξη των νευρομαστών έχει ήδη δειχθεί μέσω πειραμάτων *in situ* υβριδισμού, ανοσοφθορισμού καθώς και *in vivo* μέσω χρώσης των ενεργών κροσσωτών κυττάρων με FM1-43 σε έμβρυα morphants. Γεννήθηκε επομένως το ερώτημα εάν η έκθεση εμβρύων zebrafish σε μόρια-αναστολείς της δράσης της SET, που αποτελεί μια τελείως διαφορετική προσέγγιση, θα είχε ανάλογα αποτελέσματα.

Σκοπός της συγκεκριμένης φαρμακολογικής μελέτης ήταν η διερεύνηση των επιπτώσεων της έκθεσης εμβρύων zebrafish στο FTY720, ως μόριο-ανταγωνιστή της πρωτεΐνης SET (Pirra *et al.*, 2014). Η χημική ένωση FTY720 (Fingolimod) αποτελεί συνθετικό ανάλογο της σφιγγοσίνης S1P. Πέραν της θεραπευτικής του δράσης στη σκλήρυνση κατά πλάκας, έχει βρεθεί ότι αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών του ανοσοποιητικού, του κεντρικού νευρικού και του καρδιαγγειακού συστήματος. Η δομή του FTY720 επιτρέπει την ταχεία είσοδό του στο εσωτερικό των κυττάρων όπου εντός του πυρήνα φωσφορυλιώνεται από την SphK2. Στη φωσφορυλιωμένη του μορφή μπορεί να μεταβεί εκτός του κυττάρου όπου προσδέεται στον υποδοχέα S1PR1 και τον ενεργοποιεί. Επίσης, το FTY720 συμπεριλαμβάνεται στη λίστα των φαρμάκων με δράση ενεργοποίησης της ογκοκατασταλτικής φωσφατάσης PP2A (PAD, PP2A Activating Drug). Η ενεργοποίηση της PP2A έχει δειχθεί ότι μπορεί να γίνει άμεσα (Matsuoka *et al.*, 2003) ή μέσω σύνδεσης στη SET ως αναστολέα του ενζύμου (Saddoughi *et al.*, 2013).

Στα πλαίσια των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκε η μη-φωσφορυλιωμένη μορφή του φαρμάκου FTY720 καθώς έχει δειχθεί ότι μόνο αυτή αλληλεπιδρά με την SET και την αναστέλλει (Εικόνα 4.15A). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε την χορήγηση του φαρμάκου σε τέσσερις συγκεντρώσεις (1, 5, 7.5 και 10  $\mu\text{M}$ ). Η συγκέντρωση των 10  $\mu\text{M}$  είναι η μέγιστη που χρησιμοποιήθηκε προς αποφυγή τοξικής επίδρασης και θνησιμότητας των εμβρύων. Το στάδιο που επιλέχθηκε για την έναρξη της έκθεσης στο φάρμακο, ήταν αυτό των 24 hpf όπου τα όργανα βρίσκονται

ακόμη στην πρόδρομη, αδιαφοροποίητη μορφή τους. Η διαδικασία ολοκληρωνόταν στις 4 dpf, όπου τα όργανα είναι πλέον λειτουργικά.

Αρχικά, όπως και στην περίπτωση της παρεμπόδισης της έκφρασης των *seta/b*, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση των εκτεθειμένων προνυμφών στο FTY720 για να διαπιστωθεί κατά πόσον η έκθεση στο φάρμακο μπορεί να επάγει μορφολογικές αλλαγές. Η παρατήρηση γινόταν καθημερινά μέχρι και τη λήξη της διαδικασίας και επαναλαμβάνονταν σε όλα τα ανεξάρτητα πειράματα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.15B, καμία συγκέντρωση του φαρμάκου δεν επηρέασε μορφολογικά την ανάπτυξη των εμβρύων, ωστόσο υπήρχε κάποια επίδραση στην κολυμβητική ικανότητα των ατόμων κυρίως στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Οι διαφορές που εντοπίστηκαν αφορούσαν την μειωμένη ταχύτητα κολύμβησης καθώς και την καθυστερημένη ικανότητα αντίδρασής τους σε προκαλούμενα ερεθίσματα όπως το άγγιγμα με βελόνα.



**Εικόνα 4.15. Επίδραση του φαρμάκου FTY720 στην πρόωμη ανάπτυξη του zebrafish. (A)** Δομή του FTY720 (Fingolimod). **(B)** Μορφολογία προνυμφών 3 dpf, που έχουν εκτεθεί σε 1, 5, 7.5 και 10  $\mu$ M FTY720.



#### 4.6.2. Ανάλυση της επίδρασης του φαρμάκου FTY720 στην ανάπτυξη των νευρομαστών της πλευρικής γραμμής

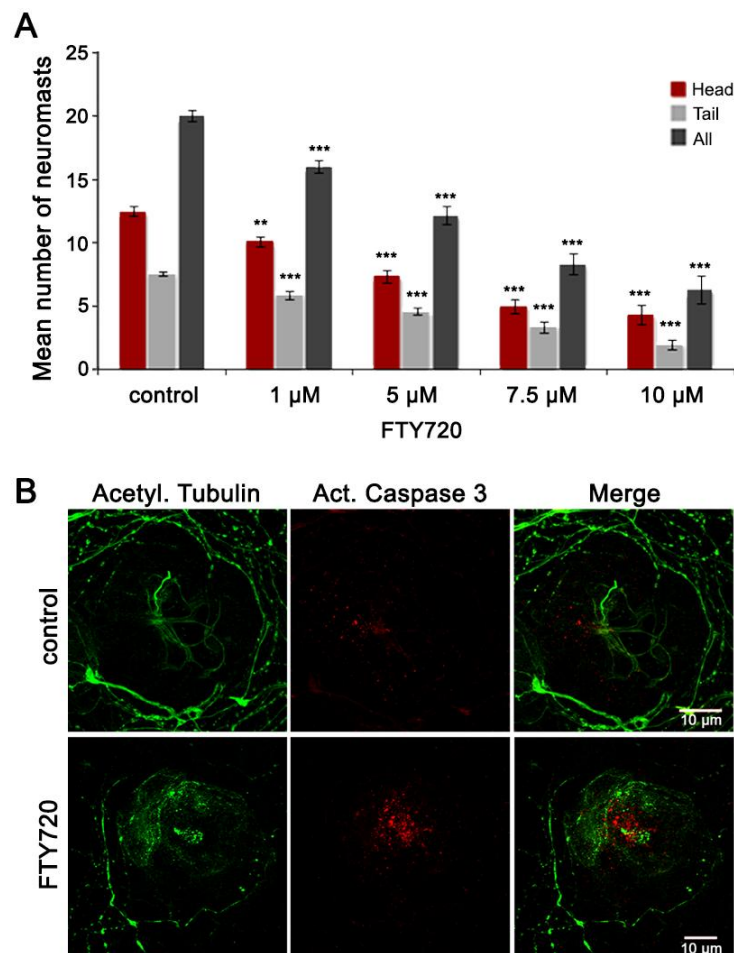
Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του φαρμάκου στην ανάπτυξη λειτουργικών νευρομαστών, πραγματοποιήθηκε *in vivo* χρώση των εκτεθειμένων προνυμφών (4 dpf) με τη φθορίζουσα χρωστική FM1-43. Υπενθυμίζεται ότι η έκθεση στο φάρμακο ξεκινά στο στάδιο των 24 hpf, αντίθετα από τη διαδικασία μικροέγχυσης αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων η οποία συμβαίνει στο στάδιο του ενός κυττάρου. Το χρονικό αυτό σημείο συμπίπτει αναπτυξιακά με την έναρξη της μεταναστευτικής κίνησης του primordium προς το ουριαίο άκρο με σκοπό το σχηματισμό της οπίσθιας πλευρικής γραμμής ο οποίος ολοκληρώνεται στις 48 hpf. Στις 4 dpf, όλοι οι ανεπτυγμένοι νευρομαστοί είναι πλήρως λειτουργικοί.

Η καταμέτρηση των ενεργών νευρομαστών έγινε μονόπλευρα στο κεφάλι και την ουρά των προνυμφών. Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα η έκθεση των εμβρύων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου οδήγησε σε μείωση των ενεργών νευρομαστών με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 4.16Α). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενα όπου μείωση των νευρομαστών διαπιστώθηκε τόσο στα MOab/MOb morphants όσο και στα crispants μετά από στοχευμένη καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *seta/b* (Εικόνα 4.14B,Γ). Σε αυτή την περίπτωση η μείωση μπορεί να οφείλεται στην ανταγωνιστική δράση του φαρμάκου έναντι των *Seta/b* ή σε κάποιον άλλο άγνωστο μηχανισμό.

Αντίστοιχα με την περίπτωση των morphants, ελέγχθηκε εάν η επίδραση του FTY720 στους νευρομαστούς οφείλεται στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού. Πραγματοποιήθηκε επομένως ανοσοφθορισμός σε προνύμφες 4 dpf μετά από έκθεση στο φάρμακο, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα της ενεργής κασπάσης 3 ενώ η σήμανση του νευρικού συστήματος έγινε με το αντίσωμα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης. Από την παρατήρηση των δειγμάτων διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων απόπτωσης παρουσία του φαρμάκου ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να έχει διαταραχθεί και η οργάνωση του νευρικού δικτύου κρίνοντας από την κατανομή της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (Εικόνα 4.16B). Το εν λόγω αποτέλεσμα έρχεται σε σύγκρουση με το αντίστοιχο στην περίπτωση των morphants (Εικόνα 4.14Δ). Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο στάδιο έναρξης της κάθε πειραματικής διαδικασίας, στον διαφορετικό τρόπο χορήγησης (προσθήκη φαρμάκου στο διάλυμα εμβρύων vs μικροέγχυση MO) όπως και στο ότι στη

μία περίπτωση προκαλείται μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών μέσω ειδικής στόχευσης ενώ στην άλλη ανταγωνιστική παρεμπόδιση της δράσης τους μέσω σύνδεσης του συνθετικού αναλόγου της S1P στις Seta/b. Να αναφερθεί σε αυτό το σημείο πως τα αμινοξέα Y122 και K209 που θεωρείται ότι μεσολαβούν αυτή τη σύνδεση στην ανθρώπινη πρωτεΐνη (Saddoughi *et al.*, 2013), βρίσκονται συντηρημένα και στις πρωτεΐνες του zebrafish (Εικόνα 4.1).

Παράλληλα με τους νευρομαστούς, αυξημένα επίπεδα απόπτωσης παρουσία φαρμάκου, ανιχνεύθηκαν και στα κροσσωτά κύτταρα των αισθητήριων κηλίδων του έσω ωτός (Παράρτημα 3, Εικόνα 3B), όπου σε αυτήν την περίπτωση το αποτέλεσμα συμφωνεί με το αντίστοιχο στα MOab morphants (Εικόνα 4.13).



**Εικόνα 4.16. Επίδραση του FTY720 στους νευρομαστούς της πλευρικής γραμμής.** (A) *In vivo* χρώση των ενεργών νευρομαστών με τη φθορίζουσα χρωστική FM1-43. Γραφική αναπαράσταση του μέσου αριθμού των ενεργών νευρομαστών βάσει της χρώσης FM1-43, σε προνύμφες zebrafish 4 dpf χωρίς να έχουν υποστεί κάποια επεξεργασία (control, n=26) και μετά από έκθεση σε 1 μM (n=28), 5 μM (n=27), 7.5 μM (n=27) και 10 μM (n=15) FTY720, όπου n ο συνολικός αριθμός των προνυμφών που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση. Τα αποτελέσματα έχουν προκύψει από τρία ανεξάρτητα πειράματα και παρατίθενται ως μέση τιμή±σφάλμα μέσης τιμής. Ο έλεγχος στατιστικώς σημαντικών

διαφορών έγινε με One Way ANOVA, ακολουθούμενη από *post hoc* ανάλυση πολλαπλών συγκρίσεων. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . **(B)** Συνδυαστικός ανοσοφθορισμός των νευρομαστών προνυμφών ελέγχου (control) και εκτεθειμένων σε 7.5  $\mu\text{M}$  FTY720 στο στάδιο των 4 dpf, με τη χρήση των αντισωμάτων anti-acetylated tubulin και anti-active caspase 3. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε με συνεστικό μικροσκόπιο υπό τις ίδιες ρυθμίσεις σάρωσης.

Συμπερασματικά, από τη χρήση τριών διαφορετικών προσεγγίσεων για την στόχευση των Seta/b τόσο σε επίπεδο έκφρασης (MOab/MOb, gRNA) όσο και σε επίπεδο δράσης (FTY720), αποδεικνύεται η σχέση των πρωτεϊνών με την ανάπτυξη των νευρομαστών και ειδικότερα των αισθητήριων κροσσωτών κυττάρων.

#### 4.7. Ανάλυση του μεταγραφώματος των *seta/b* morphants

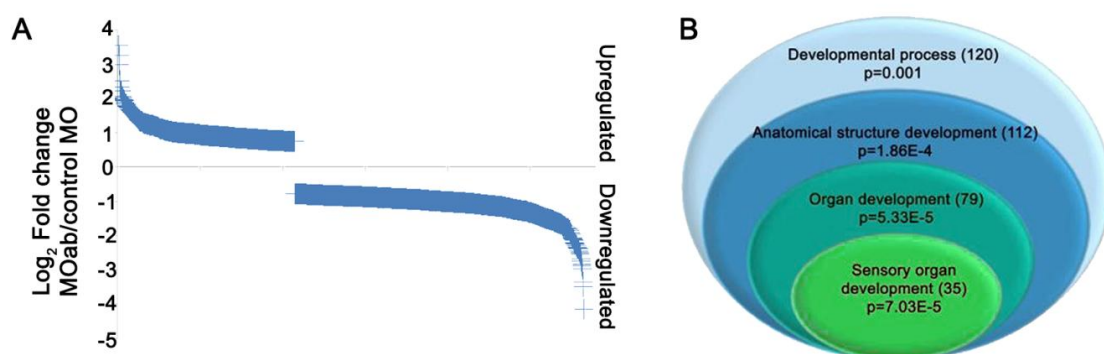
Οι αναλύσεις εντοπισμού των *seta* και *setb* σε επίπεδο μεταγράφων αλλά και πρωτεϊνών με πειράματα *in situ* υβριδισμού και ανοσοφθορισμού αντίστοιχα, ανέδειξαν την έκφραση των δυο μορίων στα αισθητήρια όργανα των εμβρύων και λαρβών zebrafish. Τα όργανα στα οποία παρουσίασαν τα δύο παράλογα γονίδια αυξημένα επίπεδα έκφρασης ήταν οι οφθαλμοί, τα κροσσωτά κύτταρα του αυτιού, οι κροσσοί των κυττάρων της οσφρητικής κοιλότητας και οι νευρομαστοί της πλευρικής γραμμής. Ειδικότερα όσον αφορά τους νευρομαστούς, τα πειράματα καταστολής των *seta/b* συνδυαστικά με την *in vivo* χρώση των morphants με τη χρωστική FM1-43 ανέδειξαν τη σχέση των *Seta/b* με την ανάπτυξη των εν λόγω οργάνων. Το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων σε συνδυασμό με το πλήθος των δράσεων στις οποίες εμπλέκεται η SET ειδικότερα σε σχέση με τη μεταγραφική ρύθμιση, πυροδότησαν τη μελέτη των επιπτώσεων της αποσιώπησης των *seta/b* στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με την διαμόρφωση του αισθητήριου συστήματος και ειδικότερα με την ανάπτυξη των οργάνων που το απαρτίζουν.

Προκειμένου να εντοπιστούν οι αλλαγές που επέφερε η καταστολή έκφρασης των *seta/b* σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης απομονώθηκε ολικό RNA από morphants (MOab) και έμβρυα ελέγχου στο στάδιο των 48 hpf και συγκρίθηκαν οι αλλαγές στο γονιδιακό πρότυπο των δύο πληθυσμών με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών. Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο στάδιο γιατί υπό το πρίσμα της ανάπτυξης σηματοδοτεί την ολοκλήρωση της μορφογενετικής διαδικασίας και της εμβρυογένεσης. Ειδικότερα όσον αφορά τον σχηματισμό των αισθητήριων οργάνων, στις 48 hpf: α) το primordium της οπίσθιας πλευρικής γραμμής ολοκληρώνει τη μετανάστευσή του προς το άκρο της ουράς ενώ έχει εναποθέσει 5 πρωτονευρομαστούς, β) τα κροσσωτά κύτταρα των αισθητήριων κηλίδων του ωτικού κυστιδίου έχουν διαφοροποιηθεί πλήρως και γ) στους οφθαλμούς είναι διακριτή η στιβάδα των φωτοϋποδοχέων ενώ οι αυξητικοί κώνοι των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς έχουν εκτείνει τις αποφύσεις τους προς τον οπτικό φλοιό.

### Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας

Από τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης προκύπτουν σύνολα διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων, τα μετάγραφα των οποίων χαρακτηρίζονται από μεταβαλλόμενα επίπεδα ως απόκριση στις προκαλούμενες μεταβολές (*seta/b* knockdown).

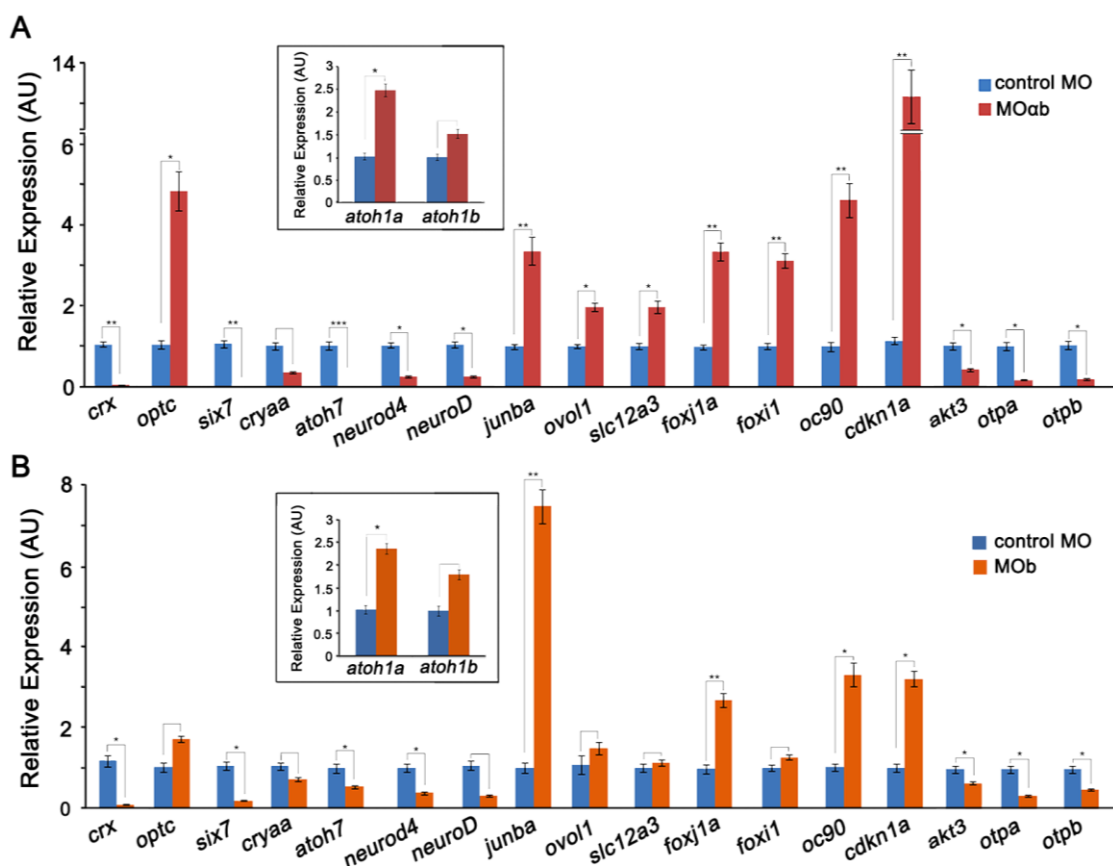
Από την επεξεργασία των τιμών των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε μια σχετική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων του συνόλου των γονιδίων που αναλύθηκαν. Θέτοντας ως κατώφλι τη διαφορά έκφρασης μεταξύ των τιμών των πειραματικών δειγμάτων με τις αντίστοιχες των δειγμάτων ελέγχου να είναι μεγαλύτερη του 1.7 ( $FC > 1.7$ ) και στατιστική σημαντικότητα  $p < 0.05$ , βρέθηκε ότι σημαντικά διαφορετική έκφραση παρουσιάζει ένα σύνολο 1128 γονιδίων. Από αυτά 427 γονίδια χαρακτηρίζονται από αύξηση των επιπέδων mRNA και τα υπόλοιπα 701 από μείωση (Εικόνα 4.17A). Περαιτέρω χαρακτηρισμός γονιδιακής οντολογίας έδειξε ότι 84 γονίδια εμπλέκονται στη μεταγραφή ενώ 31 κωδικοποιούν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης. Η εν λόγω ανάλυση ανέδειξε ακόμη ένα σύνολο γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων (Εικόνα 4.17B και Παράρτημα 4, Πίνακας 1), επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο προηγούμενα ευρήματα. Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων που προήλθαν από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών έγινε με τη χρήση της Ποσοτικής PCR Πραγματικού χρόνου (qPCR).



**Εικόνα 4.17. Ανάλυση μεταγραφικού προτύπου των *seta/b* morphants.** (A) Κατανομή του συνόλου των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων, όπως προέκυψαν από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών. Η διαφορά έκφρασης των γονιδίων στα MOab morphants υπολογίστηκε σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των εμβρύων ελέγχου και αποδίδεται σε λογαριθμική κλίμακα ( $\log_2 FC$ ) ( $FC > 1.7$ ,  $p < 0.05$ ). (B) Εποπτική παρουσίαση με διάγραμμα Venn, των εμπλουτισμένων κατηγοριών σχετιζόμενων με την διαδικασία ανάπτυξης μετά από βιοπληροφορική ανάλυση γονιδιακής οντολογίας, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GeneSpring (Agilent).

## Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR Πραγματικού χρόνου

Για τον έλεγχο αξιοπιστίας και τελικά την επαλήθευση των αποτελεσμάτων που προήλθαν από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών, χρησιμοποιήθηκε μια σαφώς πιο ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος, αυτή της qPCR. Για τη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού RNA τα οποία προήλθαν από *seta/b* morphants (MOab) και *setb* morphants (MOb) καθώς και έμβρυα ελέγχου (control MO). Η επιλογή των γονιδίων έγινε με κριτήριο τη λειτουργία τους στην ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων όπως η πλευρική γραμμή, οι οφθαλμοί και τα ώτα (Εικόνα 4.18A,B).



**Εικόνα 4.18.** Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών μέσω ποσοτικής ανάλυσης των επιπέδων mRNA επιλεγμένων γονιδίων με τη μέθοδο της qPCR. Η ανάλυση έγινε σε δείγματα που απομονώθηκαν από έμβρυα zebrafish 48 hpf μετά από μικροέγχυση (A) 7.5 ng MOab και (B) 7.5 ng MOb. Εντός πλαισίων παρουσιάζονται οι μεταβολές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *atoh1a* και *atoh1b*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

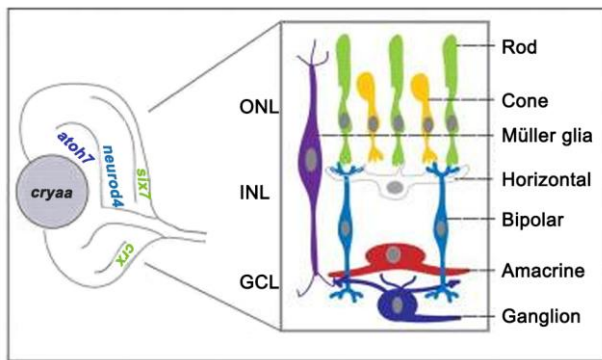
### **Πλευρική γραμμή**

Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσίασε η αυξημένη έκφραση των *Seta/b* στα αισθητήρια όργανα της πλευρικής γραμμής, τους νευρομαστούς και τα νευρικά κροσσωτά κύτταρα αυτών. Το σύνολο των γονιδίων που σχετίζεται με την ανάπτυξη της πλευρικής γραμμής και που επιβεβαιώθηκε με qPCR περιλαμβάνει το *neuroD*, το *junba*, το *ovoll* και το *slc12a3* (Εικόνα 4.18A). Το ***neuroD*** (*neurogenic differentiation 1*) κωδικοποιεί έναν bHLH μεταγραφικό παράγοντα με δράση στο primordium της πλευρικής γραμμής όπου καθορίζει τους κυτταρικούς υποτύπους (Sato and Takeda, 2013), ενώ παράλληλα είναι απαραίτητο για τη διαφοροποίηση των κροσσωτών κυτάρων των νευρομαστών (Sarrazin *et al.*, 2006). Το ***junba*** (*JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit a*) εμπλέκεται στην διαδικασία της αναγέννησης των κροσσωτών κυτάρων (Jiang *et al.*, 2014) και το ***ovoll*** (*ovo-like zinc finger 1*) συνδέει το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt με την κυτταρική μετανάστευση (Piloto and Schilling, 2010). Πέραν αυτών επιβεβαιώθηκε και το γονίδιο ***slc12a3*** (*solute carrier family 12 -sodium/chloride transporter- member 3*) το οποίο ανήκει στην οικογένεια SLC πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της κορυφαίας-βασικής πολικότητας των κροσσωτών κυτάρων στους λειτουργικούς νευρομαστούς. Οι μεταβολές των επιπέδων των υπό μελέτη μεταγράφων ως προς την αύξηση ή τη μείωσή τους, επιβεβαιώθηκαν και στα δείγματα των MOb morphants (Εικόνα 4.18B). Προκειμένου να σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα αναφορικά με το ρόλο των *seta/b* στην ανάπτυξη της πλευρικής γραμμής και τον σχηματισμό των νευρομαστών ελέγχθηκε ακόμη το ***atoh1a*** παρότι δεν συμπεριλαμβανόταν στη λίστα των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί την έκφραση ενός bHLH-μεταγραφικού παράγοντα η δράση του οποίου είναι κρίσιμη για τη διαφοροποίηση και αναγέννηση των κροσσωτών κυτάρων στους νευρομαστούς (Birmingham *et al.*, 1999; Matsuda and Chitnis, 2010). Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου μέσω qPCR έδειξε σημαντική αύξηση τόσο στα MOab όσο και στα MOb morphants. Ταυτόχρονα ελέγχθηκε και το παράλογο γονίδιο ***atoh1b*** όπου και σε αυτήν την περίπτωση σημειώθηκε μια μικρή αύξηση, χωρίς ωστόσο να είναι αξιόλογη (Εικόνα 4.18A,B- εντός πλαισίου).

## Οφθαλμοί

Τα προϊόντα των γονιδίων *seta/b* βρέθηκε ότι εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην περιφέρεια του οφθαλμού, σε μία περιοχή η οποία χαρακτηρίζεται ως μελάχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς (RPE), στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (RGCL) και στην ακτινωτή οριακή ζώνη (CMZ). Από την ανάλυση των επαγόμενων αλλαγών στο μεταγράφομα των *morphants*, βρέθηκε πως μεγάλος αριθμός διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων σχετίζεται με συγκεκριμένους τύπους κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Εξ αυτών επιλέχθηκαν τα γονίδια με τις μεγαλύτερες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασής τους και επιβεβαιώθηκαν με qPCR (Εικόνα 4.18). Αναλυτικότερα, μελετήθηκε το *crx* (*cone-rod homeobox*) το οποίο εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των φωτοϋποδοχέων (Εικόνα 4.19), εκφράζεται στα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς προωθώντας τη διαφοροποίησή τους και γενικότερα συμμετέχει στην εξειδίκευση και τη διαφοροποίηση του αμφιβληστροειδούς (Shen and Raymond, 2004). Επίσης, αναλύθηκε το *optc*, προϊόν του οποίου είναι η *opticin* η οποία ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών πλούσιων σε κατάλοιπα Λευκίνης (LRP). Η *opticin* σχηματίζεται από το επιθήλιο του ακτινωτού σώματος ενώ εντοπίζεται και στο υαλοειδές σώμα του οφθαλμού (Le Goff and Bishop, 2007). Επόμενα ήταν το *six7* (*sine oculis homeobox homolog 7*) που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα σχετικό με την έκφραση της πράσινης οψίνης των ραβδίων (Ogawa *et al.*, 2015) και το *cryaa* (*crystallin alpha A*) που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των φακών (Zou *et al.*, 2015) (Εικόνα 4.19). Τέλος, επαληθεύτηκε η μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *neurod4* (*neurogenic differentiation 4* ή *zath3*) και *atoh7* (*atonal homolog 7* ή *zath5*). Τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζουν δύο bHLH-μεταγραφικούς παράγοντες καθοριστικούς για τη νευρογένεση και τον σχηματισμό του αμφιβληστροειδούς (Park S. H. *et al.*, 2003). Το *atoh7* ήταν το γονίδιο με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης όπως διαπιστώθηκε τόσο από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών (FC= -10,19) όσο και από την qPCR. Στην περίπτωση των MOab *morphants* η καταστολή της έκφρασης των *seta/b* οδήγησε σε 200-φορές μείωση των επιπέδων έκφρασης του *atoh7* (Εικόνα 4.18A). Ωστόσο όταν κατεστάλη η έκφραση μόνο του *setb* (MOb) η μείωση ήταν σημαντικά μικρότερη (2 φορές, Εικόνα 4.18B). Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς η δράση του *Atoh7* είναι βασική για την ανάπτυξη των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς και γενικότερα για την λειτουργία της όρασης (Brown *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2001).





**Εικόνα 4.19.** Σχηματική απεικόνιση του οφθαλμού ενός εμβρύου zebrafish 48 hpf και των των κυτταρικών τύπων που απαρτίζουν τον αμφιβληστροειδή. Αριστερά διακρίνονται τα διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια που ελέγχθηκαν με qPCR. Τα χρώματα των γονιδίων είναι αντίστοιχα των κυττάρων που επηρεάζει η δράση του καθενός.

### Έσως

Η οργάνωση του αυτιού στο zebrafish χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη συγκεκριμένων υποπεριοχών οι οποίες είναι συντηρημένες και στον άνθρωπο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, συντηρημένοι φαίνεται πως είναι και οι γενετικοί μηχανισμοί που διέπουν την ανάπτυξη του αυτιού και τις επιμέρους λειτουργίες του. Δεδομένης της αυξημένης κατανομής των *Seta/b* στα κροσσωτά κύτταρα του αυτιού, επιλέχθηκαν τρία διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια των οποίων τα επίπεδα mRNA ελέγχθηκαν με qPCR. Η επιλογή έγινε αφενός λόγω της διαφοράς έκφρασης που ανέδειξε η μέθοδος των μικροσυστοιχιών και αφετέρου λόγω του ρόλου τους στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του αυτιού. Συγκεκριμένα επιβεβαιώθηκε το *foxj1a* (*forkhead box J1a*) το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα απαραίτητο για τη συναρμολόγηση και τη λειτουργία των κινητών κροσσών, όπως και για την προσάρτηση των ωτόλιθων στα κροσσωτά κύτταρα (Stubbs *et al.*, 2008; Yu X. *et al.*, 2008). Επίσης αναλύθηκε ποσοτικά η έκφραση του *foxi1* (*forkhead box i1*) που αντίστοιχα κωδικοποιεί την έκφραση μεταγραφικού παράγοντα και εκφράζεται στα πρόδρομα κύτταρα του αυτιού (Solomon *et al.*, 2003) και του *oc90* (*otoconin90*) που συμβάλλει στην κρυσταλλοποίηση των ωτόλιθων (Zhao *et al.*, 2007).

Τέλος, η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης SET με μόρια του κυτταρικού κύκλου επιβεβαιώθηκε και μέσα από τα συγκεκριμένα πειράματα καθώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών το γονίδιο με τη μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων έκφρασης λόγω καταστολής των *seta/b*, ήταν το *cdkn1a* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* ή *p21*) (Παράρτημα 4, Πίνακας 1 και Εικόνα 4.18). Αντίθετα, μειωμένη βρέθηκε η έκφραση του *akt3* το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεϊνική κινάση B (PKB). Η PKB είναι μια

κινάση σερίνης-θρεονίνης η οποία ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων bHLH και συνενεργοποιητών (Vojtek *et al.*, 2003). Αξίζει να αναφερθεί πως τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενα πειράματα ανοσοφθορισμού στα *seta/b* morphants, όπου διαπιστώθηκε μείωση των επιπέδων κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικόνα 4.11) και αύξηση της απόπτωσης (Εικόνα 4.12).

Σε όλες τις περιπτώσεις οι διαφορές των επιπέδων mRNA που ανιχνεύθηκαν για κάθε γονίδιο επιβεβαίωσαν σε ένα ποσοστό τις αντίστοιχες που είχαν προσδιοριστεί από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών. Τα προαναφερθέντα γονίδια μελετήθηκαν ως προς τις διαφορές στα επίπεδα έκφρασής τους και ως συνέπεια αποσιώπησης μόνο του *setb* (MOb) μολονότι στα συγκεκριμένα δείγματα δεν έγινε ανάλυση μεταγραφώματος. Η τάση που παρουσίαζαν τα επίπεδα mRNA των γονιδίων που εξετάστηκαν συμφωνούσε τόσο με τα αποτελέσματα qPCR των MOab όσο και με τα αντίστοιχα των μικροσυστοιχιών, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μα κυρίως τη συσχέτιση των γονιδίων *seta/b* με την ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων μέσω πιθανής αλληλεπίδρασης με βασικά μόρια.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η SET/I2PP2A, μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη γνωστή για το εύρος των δράσεών της τόσο εντός του πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Χαρακτηριστικότερες είναι η αναδιοργάνωση της χρωματίνης, η αλληλεπίδραση με τις ιστόνες ως μόριο-συνοδός, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η συμμετοχή της στην απόπτωση καθώς και η κυτταρική μετανάστευση. Επιπλέον είναι γνωστή η ισχυρή ανασταλτική της δράση έναντι της πρωτεϊνικής φωσφατάσης σερίνης-θρεονίνης PP2A, ενός εκ των βασικότερων ενζύμων στο κύτταρο. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SET ανακαλύφθηκε ως προϊόν σύντηξης με το ογκογονίδιο *CAN* λόγω φαινομένου χρωμοσωμικής μετάθεσης σε μία περίπτωση Οξείας Αδιαφοροποίησης Λευχαιμίας. Η ανακάλυψη αυτή άνοιξε το δρόμο στη διερεύνηση του ρόλου της ογκοπρωτεΐνης SET στην καρκινογένεση και την πιθανή αξιοποίησή της ως φαρμακευτικό στόχο στην αντιμετώπιση αυτής της ασθένειας. Επιπλέον, ένας σημαντικός αριθμός μελετών έχει εστιάσει στη δράση της στο νευρικό σύστημα καθώς και στο ρόλο της στην ανάπτυξη της νευροεκφυλιστικής νόσου Alzheimer.

Η αθρόα συλλογή επιστημονικών δεδομένων αναφορικά με το λειτουργικό προφίλ της SET, αν και αποκάλυψε δράσεις της σε πολλά κυτταρικά συστήματα, στερείται πληροφοριών σχετικά με το βιολογικό της χαρακτήρα σε ένα πολύπλοκο σύστημα όπως αυτό του οργανισμού. Το κενό αυτό κλήθηκε να καλύψει η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, προσφέροντας νέα γνώση αναφορικά με το φυσιολογικό ρόλο της υπό μελέτη πρωτεΐνης στην ανάπτυξη του οργανισμού-μοντέλου zebrafish. Τα χαρακτηριστικά του μικρού αυτού ψαριού, σε συνδυασμό με ένα πλήθος πλεονεκτημάτων αναφορικά με την πειραματική του χρήση, το καθιστούν ιδανικό για το λειτουργικό χαρακτηρισμό γονιδίων ειδικότερα όταν αυτά σχετίζονται με την ανάπτυξη ασθενειών στον άνθρωπο εφόσον ο βαθμός ομοιότητας μεταξύ των δύο γονιδιωμάτων είναι υψηλός.

### **Τα ορθόλογα γονίδια του SET, στο zebrafish**

Στο zebrafish υπάρχουν δύο ορθόλογα γονίδια του SET, το *seta* και το *setb* τα οποία εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και πιθανόν έχουν προκύψει από το διπλασιασμό του γονιδιώματος πριν τη διαφοροποίηση των τελεόστεων. Οι τελεόστεοι

οργανισμοί συνιστούν τη μεγαλύτερη και πιο διαφοροποιημένη ομάδα σπονδυλωτών. Η αλληλούχιση γονιδίων τελεόστεων ψαριών κατά την προ-γονιδιωματική εποχή αποκάλυψε την ύπαρξη πολλών διπλών γονιδίων σε σχέση με τα αντίστοιχα ανθρώπινα. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στην διατύπωση της υπόθεσης περί διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος πριν τη διαφοροποίηση των τελεόστεων περίπου προ 350 εκατομμυρίων χρόνων. Πέραν του διπλασιασμού του γονιδιώματος, σύμφωνα με νεότερα δεδομένα τα χρωμοσώματα των τελεόστεων έχουν υποστεί σημαντικό βαθμό αναδιατάξεων ενώ η εξέλιξη των πρωτεϊνικών τους αλληλουχιών, καθώς και των συντηρημένων μη κωδικοποιών στοιχείων τους ήταν ταχύτερη σε σχέση με άλλες κατηγορίες ψαριών ή των θηλαστικών (Ravi and Venkatesh, 2008).

Συχνά τα γονίδια που προκύπτουν από ένα φαινόμενο διπλασιασμού ενός αρχικού προγονικού γονιδίου διαφέρουν ως προς το ότι το ένα συνεχίζει να υπόκειται στην πίεση της φυσικής επιλογής και διατηρεί τα προγονικά λειτουργικά χαρακτηριστικά του, ενώ το δεύτερο αποκλίνει και συσσωρεύει μεταλλάξεις που το καθιστούν μη λειτουργικό. Υπάρχουν ωστόσο περιπτώσεις, όπου τα δύο αντίγραφα διατηρούνται. Αυτό συμβαίνει όταν και τα δύο γονίδια φέρουν συμπληρωματικές μεταλλάξεις τέτοιες ώστε οι ιδιότητες του προγονικού γονιδίου να επιμερίζονται στα δύο θυγατρικά ή λόγω απόκτησης νέας λειτουργίας του ενός εξαιτίας συσσώρευσης ευνοϊκών μεταλλάξεων. Ένας ακόμη λόγος μπορεί να είναι η επίδραση της γονιδιακής δόσης (Glasauer and Neuhauss, 2014). Στην περίπτωση των γονιδίων *seta/b* εκτός του ότι έχουν διατηρηθεί και τα δύο αντίγραφα στην πορεία της εξέλιξης, επιπλέον, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα στις αμινοξικές τους αλληλουχίες (94%). Αυτό αποδεικνύει την υψηλή συντήρηση του αρχικού γονιδίου καθώς και ότι δεν έχουν προστεθεί νέα χαρακτηριστικά σε κανένα εκ των δύο γονιδίων που να τους προσδίδουν κάποια νέα ιδιότητα. Παράλληλα υποδεικνύει ότι το σύνολο των λειτουργιών του προγονικού γονιδίου πιθανόν επιτελείται από τη συνδυαστική τους δράση. Αντίστοιχα υψηλά είναι τα επίπεδα ομοιότητας και με την ανθρώπινη πρωτεΐνη (95% με τη *Seta* και 96% με τη *Setb*), υποστηρίζοντας κοινό βιολογικό ρόλο.

## **Ανάλυση προτύπου έκφρασης των γονιδίων *seta/b* κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του zebrafish**

Με σκοπό να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ των δράσεων των δύο γονιδίων στο zebrafish, μελετήθηκαν τα πρότυπα έκφρασης των μεταγράφων τους τόσο κατά την εμβρυική όσο και κατά την προνυμφική ανάπτυξη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του *in situ* υβριδισμού τα mRNAs των *seta/b* εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο κατανομής χαρακτηριστικό της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος. Τα αποτελέσματα αυτά και ειδικότερα η έκφραση στον εγκέφαλο, το κεντρικό νευρικό σύστημα, τους οφθαλμούς, το όριο μεσεγκεφάλου-οπίσθιου εγκεφάλου και τον νωτιαίο μυελό έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη από τους Rauch *et al.* (2003) οι οποίοι περιορίστηκαν κυρίως στα στάδια των 24 και 48 hpf. Μελετώντας την έκφραση των μεταγράφων σε μετέπειτα αναπτυξιακό στάδιο (5 dpf), ανιχνεύθηκε σήμα στο σύστημα της πλευρικής γραμμής (στηρικτικά και κροσσωτά κύτταρα), στο έσω ους (κροσσωτά κύτταρα ακουστικών ακρολοφιών) και στους οφθαλμούς στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCs) του αμφιβληστροειδούς και στην ακτινωτή οριακή ζώνη (CMZ). Η σχέση της SET με τα RGCs είναι γνωστή και στο *Xenopus* όπου με τη χρήση καλλιέργειας κυττάρων αμφιβληστροειδούς εμβρυϊκής προέλευσης, διαπιστώθηκε ότι η SET ως κυτταροπλασματικός συμπαράγοντας της NF-protocadherin δρα στη ρύθμιση της αξονογένεσης και της επιμήκυνσης των νευραξόνων (Piper *et al.*, 2008). Ταυτόχρονα, το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ενισχύει η αυξημένη έκφραση της SET σε γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή που απομονώθηκαν από έμβρυα ποντικού. Ομοίως και σε αυτή την περίπτωση, η δράση της αφορά στη ρύθμιση της αύξησης των νευραξόνων ενώ παράλληλα επηρεάζει και την αναγεννητική τους ικανότητα έπειτα από πρόκληση βλάβης (Trakhtenberg *et al.*, 2014). Από τα παραπάνω προκύπτει συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που έχουν προέλθει από *in vivo* πειράματα σε έμβρυα σε σχέση με αντίστοιχα από καλλιέργειες κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα διαπιστώνεται ότι η έκφραση και η δράση της SET στα RGCs είναι συντηρημένη.

Ο χαρακτηρισμός των εκφραζόμενων πρωτεϊνών Seta και Setb έγινε με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων για τη μελέτη τόσο των επιπέδων τους κατά την πρώιμη ανάπτυξη (~4 hpf -120 hpf) όσο και του προτύπου κατανομής τους. Αν και σε χαμηλή ποσότητα συγκριτικά με τα επόμενα στάδια, η ανίχνευση των δύο πρωτεϊνών ήταν σαφής από τις 3.5-4 hpf (Παράρτημα 2, Εικόνα 1), υποδεικνύοντας την παρουσία πρωτεϊνών

μητρικής προέλευσης. Η σύνθεση των μορίων μητρικής επίδρασης ξεκινά κατά την ωογένεση και τα μόρια διατηρούνται κατά την εμβρυογένεση, μετά την επακόλουθη ενεργοποίηση του ωαρίου (ολοκλήρωση της μείωσης II) και τη γονιμοποίησή του. Από αυτό το σημείο έως και την ενεργοποίηση του ζυγωτικού DNA, πραγματοποιούνται γρήγορες και συγχρονισμένες κυτταρικές διαιρέσεις. Συνεπώς, όλες οι βασικές κυτταρικές διεργασίες μέχρι τότε διεκπεραιώνονται αποκλειστικά από τα μητρικά προϊόντα. Τέτοιες διαδικασίες περιλαμβάνουν την ωρίμανση του ωοκυττάρου, τη γονιμοποίηση του ωαρίου (σύντηξη προπυρήνων), το μεταβολισμό του ζυγωτού, τις αυλακωτικές διαιρέσεις (καρυοκίνηση, κυτοκίνηση) καθώς και τις διακυτταρικές επαφές (Lindeman and Pelegri, 2010). Συγκεκριμένα για τη διαδικασία της ωρίμανσης, έχει βρεθεί σε ωοκύτταρα ποντικού ότι η δράση της SET συμβάλλει σε αυτή, καθώς είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά τη Μετάφαση της Μείωσης II (Chambon *et al.*, 2013).

Καθ' όλες τις κυτταρικές διαιρέσεις έως και τις 4 hpf το γονιδίωμα του ζυγωτού παραμένει σε ανενεργή κατάσταση το οποίο πρακτικά σημαίνει πως κατάλληλοι ρυθμιστικοί παράγοντες διατηρούν συμπυκνωμένη τη δομή της χρωματίνης. Οι παράγοντες αυτοί απομακρύνονται πριν την έναρξη της μεταγραφής επιτρέποντας στη χρωματίνη να αποκτήσει πιο χαλαρή διαμόρφωση. Λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο της SET στη μεταγραφική ρύθμιση, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι οι Seta/b συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος ως παράγοντες ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.

Πέραν των επιπέδων έκφρασης αναλύθηκε και η κατανομή των πρωτεϊνών Seta/b σε έμβρυα (48 hpf) και προνύμφες zebrafish (7 dpf). Η εικόνα που παρουσίασαν τα δύο υπό μελέτη στάδια ως προς τις θέσεις εντοπισμού των Seta/b, είναι αντίστοιχη του προτύπου των μεταγράφων, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων *in situ* υβριδισμού. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν στην οσφρητική κοιλότητα, στους οφθαλμούς περιμετρικά του φακού (RGCL) και του αμφιβληστροειδούς (RPE) και στους νευρομαστούς της πλευρικής γραμμής. Από την ανάλυση του ανοσοφθορισμού αναδείχθηκε επιπλέον η έκφραση των πρωτεϊνών στους κροσσούς του οσφρητικού επιθηλίου και των ακουστικών ακρολοφιών του έσω ωτός. Αξιοσημείωτη, επίσης, ήταν η κατανομή τους στα κροσσωτά κύτταρα των νευρομαστών, όπου οι Seta/b βρέθηκε ότι εντοπίζονται εξίσου στους στερεοκροσσούς και τον κινητό κροσσό.

Συμπερασματικά από τα παραπάνω προκύπτει η συσχέτιση της δράσης των *Seta/b* με την ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων του zebrafish κατά την εμβρυογένεση και ταυτόχρονα υποδεικνύεται η σύνδεσή τους με το σχηματισμό των κροσσών.

### **Επιπτώσεις της καταστολής των γονιδίων *seta/b* στην εμβρυογένεση**

Προκειμένου να αναλυθεί περαιτέρω ο φυσιολογικός ρόλος των *seta/b* στην εμβρυϊκή ανάπτυξη του zebrafish, πραγματοποιήθηκαν πειράματα καταστολής της γονιδιακής έκφρασης. Χρησιμοποιήθηκε η στρατηγική των αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης, η οποία περιελάμβανε τον σχεδιασμό MO με δράση παρεμπόδισης της μετάφρασης έναντι των *seta/b* μεταγράφων.

Η μικροέγχυση των MO σε έμβρυα zebrafish στο στάδιο του ενός κυττάρου είχε ως συνέπεια την επιβράδυνση του ρυθμού ανάπτυξης των morphants συνοδευόμενη από μορφολογικές αλλαγές τόσο στην περιοχή του κεφαλιού όσο και της ουράς. Χαρακτηριστικότερες ήταν η κύρτωση του σώματος και η εσωτερική κάμψη της ουράς προς την περιοχή της λεκίθου, ενώ αισθητή ήταν και η επίδραση στο μέγεθος και το σχήμα των οφθαλμών. Ακόμη η εκδήλωση των φαινοτυπικών αλλαγών ήταν κλιμακούμενης έντασης λόγω δόσο-εξαρτώμενης δράσης των MO.

Η ανάπτυξη των παραπάνω φαινοτύπων συνάδει με το πρότυπο κατανομής των πρωτεϊνών *Seta/b* στους οφθαλμούς και την πλευρική γραμμή. Ειδικότερα σχετικά με την κύρτωση του σώματος των εμβρύων, αντίστοιχος φαινότυπος έχει δειχθεί και σε άλλες μελέτες οι οποίες ασχολήθηκαν με τον λειτουργικό χαρακτηρισμό (με τη χρήση MO) πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο σχηματισμό και την ικανότητα κίνησης των κροσσών στο zebrafish (Bontems *et al.*, 2014; Choksi *et al.*, 2014; Jurisch-Yaksi *et al.*, 2013). Λαμβάνοντας υπόψη τον εντοπισμό των *Seta/b* στους κροσσούς των αισθητήριων κυττάρων των νευρομαστών, θα μπορούσε να υποτεθεί η σύνδεση της ανάπτυξης του συγκεκριμένου φαινοτύπου με διαταραχές στην ανάπτυξη ή τη λειτουργία των κροσσών λόγω καταστολής των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

Η καθυστερημένη ανάπτυξη των morphants σε συνδυασμό με το σύνολο των παραμορφώσεων που τα χαρακτηρίζουν θα μπορούσαν να αποδοθούν επίσης στην απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή/και του κυτταρικού θανάτου. Πράγματι, η χρώση των morphants με κατάλληλους αποπτωτικούς δείκτες (acridine orange, anti-active caspase 3), έδειξε αυξημένες εστίες κυτταρικού θανάτου στην περιοχή του

οφθαλμού, και στη μέση του κορμού όπου τα έμβρυα εμφανίζουν κύρτωση (Εικόνα 4.12). Συμπληρωματικά αυτού, σημαντικά μειωμένα βρέθηκαν τα επίπεδα πολλαπλασιασμού (Εικόνα 4.11). Αναφορικά με τους οφθαλμούς, εστίες απόπτωσης εντοπίστηκαν τόσο περιμετρικά του αμφιβληστροειδούς, πιθανόν στην περιοχή του μελάγχρου επιθηλίου, όσο και πιο κεντρικά προς τον φακό. Το παρόν αποτέλεσμα επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες που συνδέουν τη SET με την απόπτωση κυττάρων RGC που απομονώθηκαν από έμβρυο ποντικού. Έχει δειχθεί ότι η έκφραση της SET στα γαγγλιακά κύτταρα αυξάνεται στην πορεία της ανάπτυξης και πως η υποκυτταρική της εντόπιση στη μεμβράνη μπορεί να επάγει την αύξηση των νευριτών, ενώ στον πυρήνα να την παρεμποδίζει (Trakhtenberg *et al.*, 2014). Ειδικότερα όσον αφορά την απόπτωση, έχει βρεθεί πως μία ισομορφή της SET (αμινοτελική περιοχή, 25 kDa) πιθανό προϊόν πρωτεολυτικής σχάσης, ευθύνεται για την πρόκληση του θανάτου των εν λόγω κυττάρων (Trakhtenberg *et al.*, 2015).

Παράλληλα, η μειωμένη ανίχνευση εστιών διαιρούμενων κυττάρων (anti-pH3) επιβεβαιώνει τη σχέση της SET με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, ο προσδιορισμός εμπλουτισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών μέσα από την ανάλυση γονιδιακής οντολογίας στο μεταγράφομα των MOab morphants, κατέδειξε τη σηματοδότηση Wnt, με τα περισσότερα μέλη του μονοπατιού να παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Το συγκεκριμένο εύρημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό αφενός γιατί συμφωνεί με τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού (anti-pH3) και αφετέρου γιατί το μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -catenin είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων των νευρομαστών (Head *et al.*, 2013).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η έκφραση των γονιδίων *seta/b* στα κροσσωτά κύτταρα των αισθητήριων ακουστικών δομών. Οι λόγοι που προκάλεσαν αυτό το ενδιαφέρον είναι: πρώτον γιατί η λειτουργία των δομών αυτών είναι άμεσα συνδεδεμένη με τις αισθήσεις της ακοής και της ισορροπίας, δεύτερον γιατί τα κύτταρα που τις απαρτίζουν είναι όμοια των αντίστοιχων στους νευρομαστούς και τρίτον γιατί είναι συντηρημένα στα ανώτερα θηλαστικά, όπου αντίθετα από το zebrafish στερούνται αναγεννητικής ικανότητας. Επομένως ελέγχθηκε κατά πόσον η καταστολή των *Seta/b* μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση των κροσσωτών κυττάρων του έσω ωτός. Η χρώση των MOab morphants (48 hpf) με το αντίσωμα της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 έδειξε σημαντική αύξηση των εστιών απόπτωσης στα κροσσωτά κύτταρα της εμπρόσθιας ακουστικής κηλίδας η οποία βρίσκεται εντός του ελλειπτικού κυστιδίου και σε αυτήν



προσαρτάται ο μικρότερος ωτόλιθος (ισορροπία, ευθύγραμμη κίνηση). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι εστίες εντοπίζονται κυρίως στην κορυφαία πλευρά των κροσσωτών κυττάρων και ειδικότερα στο επίπεδο των κροσσών όπου υπενθυμίζεται ότι κατανέμονται οι Seta/b. Όμοια ήταν τα αποτελέσματα και μετά από έκθεση εμβρύων zebrafish στο FTY720, ένα φάρμακο με δράση ανταγωνιστή έναντι της SET. Αντίστοιχα, ανιχνεύθηκε σημαντική απόπτωση εντός της ωτικής κοιλότητας, η οποία ήταν εντοπισμένη στις περιοχές των ακουστικών κηλίδων και ειδικότερα στο επίπεδο όπου τοποθετούνται οι ωτόλιθοι, την περιοχή δηλαδή των κροσσών (Παράρτημα 3, Εικόνα 3B).

Ταυτόχρονα το μέγεθος των ωτόλιθων στα morphants επίσης φάνηκε να έχει επηρεαστεί ωστόσο πρόκειται για μία αδρή εκτίμηση η οποία έχει προέλθει από την παρατήρηση των εμβρύων και δεν υποστηρίζεται από δεδομένα ποσοτικοποίησης. Συνδυαστικά από τα παραπάνω συμπεραίνεται η λειτουργική σχέση μεταξύ των πρωτεϊνών Seta/b και των αισθητήριων περιοχών του έσω ωτός. Ο ρόλος των Seta/b στην ακοή και στην ισορροπία θα διερευνηθεί μελλοντικά μέσω πειραμάτων ανάλυσης συμπεριφοράς.

### ***Έλεγχος αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων που προήλθαν από τη χρήση των MO***

Συχνά τα αποτελέσματα που επιφέρει η χρήση των αντινοηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης, αντιμετωπίζονται με σκεπτικισμό δεδομένων των επιπτώσεων της μη-ειδικής δράσης τους. Η μέθοδος των MO χρησιμοποιήθηκε στο zebrafish πρώτη φορά το 2000, από τους Nasevicius A. και Ekker S., με σκοπό τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου στο συγκεκριμένο *in vivo* σύστημα. Η επιτυχία εφαρμογής των MO στο zebrafish σε συνδυασμό με την αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματός του και την έλλειψη καλύτερων μεθόδων καταστολής γονιδίων *in vivo*, συνετέλεσαν σημαντικά στην ευρεία αποδοχή και διάδοσή τους. Ωστόσο, έντονος ήταν ο προβληματισμός σχετικά με την ανάπτυξη μη ειδικών επιπτώσεων δίνοντας το έναυσμα σε κορυφαίους επιστήμονες των πεδίων έρευνας στο zebrafish και το *Xenopus*, να δημοσιεύσουν μια σειρά κατευθυντήριων γραμμών συμπεριλαμβανομένων των δοκιμασιών ελέγχου και των πειραμάτων διάσωσης (Bedell *et al.*, 2011; Blum *et al.*, 2015; Eisen and Smith, 2008; Stainier *et al.*, 2017). Επιπλέον, η αδιάκοπη πρόοδος της τεχνολογίας και η ανάπτυξη νέων αξιόπιστων μεθόδων γενετικής ανάλυσης μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης, όπως το σύστημα CRISPR, επιτρέπουν τη σύγκριση των

αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων και τελικά την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Προκειμένου να αποκλειστεί η τυχαία δράση των MO που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τη στόχευση των *seta/b*, ελέγχθηκε επισταμένως τόσο η αποτελεσματικότητα όσο και η εξειδίκευσή τους έναντι των γονιδίων-στόχων. Τα αποτελέσματα των MO με δράση παρεμπόδισης της μετάφρασης (MOab) συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα ενός δεύτερου αντινοσηματικού ολιγομερούς (MOb) με μηχανισμό παρεμπόδισης του ματίσματος, μέσα από πειράματα δοσοαπόκρισης στην ανάπτυξη φαινοτύπων. Επιπλέον με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι των *Seta/b* επιβεβαιώθηκε η ειδική και αποτελεσματική δράση και των δύο MO με ανοσοαποτύπωση Western και με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Ένας τρίτος τρόπος αφορούσε τα πειράματα διάσωσης φαινοτύπου τα οποία περιελάμβαναν ταυτόχρονη έγχυση mRNA του ανθρώπινου γονιδίου *SET* με το MOab. Τέλος, έγινε σύγκριση των μεταβολών που χαρακτηρίζαν τα *morphants* με τις αντίστοιχες που προκάλεσε η εφαρμογή του συστήματος CRISPR-Cas9.

Όσον αφορά την ενεργοποίηση του μηχανισμού απόπτωσης στα *set* *morphants*, βάσει της βιβλιογραφίας θα μπορούσε να αποδοθεί στην ανάπτυξη off-target effects που οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων της p53. Σύμφωνα με την μελέτη των Robu *et al.* (2007), προκειμένου να εξαλειφθεί αυτή η πιθανότητα θα πρέπει να εγχύεται στα έμβρυα ταυτόχρονα με το MO του υπό μελέτη γονιδίου και το p53 MO, έτσι ώστε να καταστείλει την έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης και να αποκαλυφθεί η πραγματική σχέση μεταξύ του γονιδίου-στόχου και των επαγόμενων φαινοτυπικών αλλαγών.

Στην περίπτωση της SET, η συμβολή της στην απόπτωση έχει δειχθεί σε πολλές περιπτώσεις υπό διάφορες συνθήκες, με αρκετές αναφορές να εστιάζουν σε αυτή τη δράση της στο νευρικό σύστημα (Liu Z. *et al.*, 2008; Madeira *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2007; Trakhtenberg *et al.*, 2015). Ειδικότερα όσον αφορά τη σχέση της SET με την p53, έχει δειχθεί ότι σε συνθήκες κυτταρικού stress η SET παρεμποδίζει την ακετυλίωση της p53 αποτρέποντας έτσι την πρόσδεσή της στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων και ταυτόχρονα αναστέλλει την αποπτωτική απόκριση (Kim J. Y. *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). Επομένως στη συγκεκριμένη περίπτωση, η χρήση του p53 MO, δεν αποτέλεσε πρακτικό εργαλείο ελέγχου ανάπτυξης μη-ειδικών επιπτώσεων λόγω τυχαίας δράσης του *seta/b* MO.

## **Επιπτώσεις της καταστολής των γονιδίων *seta/b* στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των εμβρύων**

Η απάντηση στην ερώτηση σχετικά με τις επαγόμενες αλλαγές λόγω καταστολής των *Seta/b* σε μοριακό επίπεδο, δόθηκε με την ανάλυση του μεταγραφώματος των *set morphants*. Η συσχέτιση μεταξύ των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων με αντίστοιχες βιολογικές λειτουργίες δόθηκε μέσω ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας η οποία αποκάλυψε τη σύνδεση σημαντικού αριθμού μεταγράφων με την ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων του zebrafish. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα αναφορικά με τα πρότυπα έκφρασης των προϊόντων των γονιδίων *seta/b*.

Αναλύοντας περαιτέρω τη λίστα των συγκεκριμένων γονιδίων διαπιστώθηκε η δράση πολλών εξ αυτών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, ως μεταγραφικοί παράγοντες. Ταυτόχρονα τα αποτελέσματα της ανάλυσης qPCR, ανέδειξαν ως σημαντικά μεταβαλλόμενα γονίδια το *atoh7* και το *atoh1a*. Πρόκειται για δύο γονίδια τα προϊόντα των οποίων ανήκουν στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων *atonal* με χαρακτηριστική bHLH (basic Helix-Loop-Helix) δομή. Η δράση τους είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη νευρογένεση και συγκεκριμένα με την εξειδίκευση και τη λειτουργία των μηχανοευαίσθητων κυττάρων των αισθητήριων οργάνων (Cai T. and Groves, 2015). Το γονίδιο *atonal* ανακαλύφθηκε στη *Drosophila* ως προνευρικός (proneural) μεταγραφικός παράγοντας. Μάλιστα υποστηρίζεται ο συντηρημένος ρόλος του *atonal* στην ανάπτυξη ενός αρχικού αισθητήριου οργάνου το οποίο αποτέλεσε εξελικτικό κοινό πρόγονο των μηχανοϋποδεκτικών και φωτοϋποδεκτικών οργάνων (Niwa *et al.*, 2004). Στα σπονδυλωτά αυτές οι δύο βασικές λειτουργίες επιμερίστηκαν λόγω γονιδιακού διπλασιασμού σε δύο νέα γονίδια: το *atoh7* βασικό ρυθμιστή της ανάπτυξης των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς και το *atoh1* με κεντρικό ρόλο στο σχηματισμό των μηχανοαισθητήριων κυττάρων (κροσσωτά κύτταρα) (Jarman and Groves, 2013).

### ***Ο ρόλος του atoh7 στη νευρογένεση των οφθαλμών***

Το *atoh7* (πρώην *ath5*), που συνιστά το γονίδιο με τη μεγαλύτερη μείωση επιπέδων έκφρασης στα *morphants*, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη σηματοδότηση της έναρξης της διαφοροποίησης των γαγγλιακών κυττάρων (Kay *et al.*, 2005). Μάλιστα απώλεια λειτουργίας του *atoh7* αποτρέπει το σχηματισμό της στιβάδας

των γαγγλιακών κυττάρων στο zebrafish όπως έχει δειχθεί σε αντίστοιχο μετάλλαγμα με χαρακτηριστικό φαινότυπο απώλειας όρασης (Kay *et al.*, 2001). Αντίστοιχη αδρανοποίηση του ομόλογου γονιδίου σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων όπως και του οπτικού νεύρου (Brown *et al.*, 2001). Στον άνθρωπο, έχει βρεθεί πως η απουσία μιας γενωμικής περιοχής που βρίσκεται εκατέρωθεν ενός *cis* ρυθμιστικού στοιχείου ανοδικά του *ATOH7*, ευθύνεται για την εκδήλωση της ασθένειας NCRNA (Nonsyndromic Congenital Retinal Nonattachment). Η εν λόγω ασθένεια χαρακτηρίζεται από απώλεια της στιβάδας γαγγλιακών κυττάρων, αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς και εκ γενετής τύφλωση (Ghahsvand *et al.*, 2011).

Σύμφωνα με προκαταρκτικά πειράματα, σημαντική απώλεια της στιβάδας των γαγγλιακών κυττάρων διαπιστώθηκε και σε προνύμφες zebrafish έπειτα από στόχευση των *seta/b* είτε σε επίπεδο γονιδίου μέσω CRISPR είτε σε επίπεδο δράσης πρωτεΐνης έπειτα από έκθεση στο φάρμακο FTY720. Όπως αποκάλυψε η χρώση των προνυμφών (4 dpf) με το αντίσωμα anti-zn8, που αποτελεί δείκτη της στιβάδας των γαγγλιακών κυττάρων, και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε ελλιπής σχηματισμός της εν λόγω στιβάδας ενισχύοντας περαιτέρω τη σύνδεση των *Seta/b* με την έκφραση ή δράση του *atoh7*.

### **Ο ρόλος του *atoh1* στην ανάπτυξη των νευρομαστών**

Το *atoh1* κωδικοποιεί έναν bHLH μεταγραφικό παράγοντα απαραίτητο για τη διαφοροποίηση των κροσσωτών κυττάρων τόσο στις αισθητήριες δομές του αυτιού (Bermingham *et al.*, 1999) όσο και στους νευρομαστούς της πλευρικής γραμμής (Sarrazin *et al.*, 2006). Στο zebrafish υπάρχουν δύο γονίδια *atoh1a* και *atoh1b* με διακριτά πρότυπα έκφρασης και δράσης τόσο χρονικά όσο και χωρικά όσον αφορά τη διαφοροποίηση και την αναγέννηση των αισθητήριων κροσσωτών κυττάρων.

Κατά το σχηματισμό της οπίσθιας πλευρικής γραμμής σχηματίζονται οι πρωτονευρομαστοί. Η διαδικασία ωρίμανσης των πρωτονευρομαστών ξεκινά με το σχηματισμό μιας προνευρικής συστάδας σε σχήμα ροζέτας κεντρικά της οποίας εντοπίζεται ένα κύτταρο που εκφράζει το *atoh1a*. Η έκφραση του συγκεκριμένου παράγοντα είναι καθοριστική για τη διαφοροποίηση του κεντρικού κυττάρου σε αισθητήριο κροσσωτό. Ταυτόχρονα, ο ίδιος παράγοντας αποτρέπει τη διαφοροποίηση των παρακείμενων στηρικτικών κυττάρων σε κροσσωτά μέσω πλευρικής αναστολής (Itoh and Chitnis, 2001). Η έκφραση του *atoh1b* στα συγκεκριμένα κύτταρα κατά την ωρίμανση των

προνευρομαστών έχειδειχθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση και διατήρηση των υψηλών επιπέδων του *atoh1a*. Η απορρύθμιση της περιορισμένης (restricted) έκφρασης του *atoh1a* στο κεντρικό κύτταρο έχει ως συνέπεια την υπερπαραγωγή των κροσσωτών κυττάρων τα οποία ωστόσο, καθώς συνεχίζει η διαδικασία ωρίμανσης οδηγούνται σε απόπτωση (Matsuda and Chitnis, 2010). Αντίστοιχα, η καταστολή της έκφρασης του *atoh1a* βρέθηκε ότι περιορίζει σημαντικά τον σχηματισμό των κροσσωτών κυττάρων του έσω ωτός, χωρίς όμως να επηρεάζει τα κύτταρα προσάρτησης (tether cells) των ωτόλιθων τα οποία εμφανίζονται σε πιο πρώιμο στάδιο (22 hpf) και η ανάπτυξή τους ελέγχεται κυρίως από το *atoh1b* (Millimaki *et al.*, 2007). Στην περίπτωση των MOab morphants, η καταστολή των Seta/b οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων *atoh1a* υποδεικνύοντας πιθανό ρόλο των δύο πρωτεϊνών στον έλεγχο της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου.

Σε λειτουργικό επίπεδο, η καταστολή της έκφρασης των *seta/b* είχε σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των νευρομαστών και ειδικότερα των κροσσωτών κυττάρων, όπως αποκάλυψε η *in vivo* επώαση των morphants με τη χρωστική FM1-43. Η σημαντικά μειωμένη πρόσληψη της λιπόφιλης αυτής ουσίας-δείκτη νευρωνικής ενεργότητας αποδεικνύει τη σχέση των Seta/b με την ανάπτυξη των κροσσωτών κυττάρων καθώς και τη σημασία της δράσης τους στους κροσσούς, στη λειτουργία των οποίων αποδίδεται η μηχανοϋποδοκτική ικανότητα των κροσσωτών κυττάρων. Μείωση του αριθμού των ενεργών νευρομαστών διαπιστώθηκε και στα crispants (gRNA+Cas9), επιβεβαιώνοντας ως εναλλακτική μέθοδος γονιδιακής στόχευσης, την επίδραση των *seta/b* στη λειτουργία των αισθητήριων αυτών οργάνων. Παράλληλα τα πειράματα ανοσοφθορισμού με το αντίσωμα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης, έδειξαν μειωμένο αριθμό κροσσωτών κυττάρων στους νευρομαστούς της πλευρικής γραμμής των morphants, ενώ η ανάλυση απόπτωσης δεν έδειξε αύξηση στα επίπεδα κυτταρικού θανάτου, υποδεικνύοντας πως δεν είναι αυτός ο υπεύθυνος μηχανισμός για τη μείωση του αριθμού των λειτουργικών νευρομαστών.

Η σχέση των Seta/b με τη λειτουργία των κροσσωτών κυττάρων αναλύθηκε και στις προνύμφες που είχαν εκτεθεί στον φαρμακολογικό αναστολέα FTY720. Η παρατηρούμενη μείωση του αριθμού των λειτουργικών νευρομαστών μέσω FM1-43, επιβεβαίωσε τα αντίστοιχα αποτελέσματα στα morphants και crispants, ενισχύοντας το ρόλο των πρωτεϊνών στην ανάπτυξη/δράση των αισθητήριων αυτών οργάνων. Περαιτέρω ανάλυση για τη διερεύνηση πιθανής ενεργοποίησης του μηχανισμού απόπτωσης των κροσσωτών κυττάρων, έδειξε την ύπαρξη αυξημένου αριθμού εστιών σε σχέση με τα

δείγματα ελέγχου, υποδεικνύοντας πως η έκθεση των εμβρύων στο φάρμακο ενεργοποιεί μηχανισμούς που οδηγούν τα κροσσωτά κύτταρα σε θάνατο. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αντίθετο στην περίπτωση των morphants όπου δεν ανιχνεύθηκε διαφορά στα επίπεδα απόπτωσης λόγω καταστολής των Seta/b. Η διαφορά αυτή πιθανά οφείλεται στην ενεργοποίηση διαφορετικών -στην κάθε περίπτωση- δικτύων αλληλεπιδράσεων με μόρια-ρυθμιστές.

Σε αντίστοιχα αποτελέσματα οδήγησε παρόμοια μελέτη η οποία περιελάμβανε τη φαρμακολογική αναστολή της JNK (c-Jun N-terminal Kinase). Η JNK είναι βασική κινάση του ομώνυμου σηματοδοτικού μονοπατιού με δράσεις στην κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη φλεγμονώδη απόκριση και την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Στο zebrafish έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται στην εμβρυογένεση και την οργανογένεση. Ειδικότερα όσον αφορά τους νευρομαστούς, η αναστολή της JNK μέσω έκθεσης των εμβρύων σε έναν ειδικό αναστολέα, οδήγησε στη μείωση του αριθμού των κροσσωτών κυττάρων, στη μείωση του πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων και παραμονή τους στη G2/M και στην αύξηση της απόπτωσης στους νευρομαστούς προκαλώντας ταυτόχρονα αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *p53* και *p21* (Cai C. *et al.*, 2016). Η σχέση της JNK με τη SET έχειδειχθεί στα πλαίσια της ογκογένεσης όπου η αυξημένη αναστολή της PP2A από την υπερεκφραζόμενη SET βρέθηκε ότι επάγει την ενεργοποίηση της JNK (Al-Murrani *et al.*, 1999).

Επιπλέον των νευρομαστών, η φαρμακολογική αναστολή των Seta/b οδήγησε σε αύξηση της απόπτωσης στα κροσσωτά κύτταρα του αυτιού, αντίστοιχη αυτής που ανιχνεύθηκε στα morphants. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κροσσωτά κύτταρα του έσω ωτός στα θηλαστικά αποτελεί χαρακτηριστική παρενέργεια της δράσης διαφόρων ουσιών γνωστών για την ωτοτοξική τους δράση. Σε αυτά συγκαταλέγονται κάποια βαρέα μέταλλα (όπως ο υδράργυρος και ο χαλκός) και συγκεκριμένα αντιβιοτικά (όπως η νεομυκίνη και η στρεπτομυκίνη που ανήκουν στην κατηγορία των αμινογλυκοσιδών). Περαιτέρω μελέτη της εμπλοκής των αμινογλυκοσιδών στην καταστροφή των κροσσωτών κυττάρων, έδειξε την αποδιοργάνωση των κροσσών και την επακόλουθη ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας λόγω οξειδωτικού stress. Η συγκέντρωση αμινογλυκοσιδών στο εσωτερικό των κυττάρων οδηγεί στο σχηματισμό αντιδραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και

ελευθέρων ριζών η συσσώρευση των οποίων επάγει τον κυτταρικό θάνατο μέσω του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού .

Η συμβολή της SET στην αποπτωτική διαδικασία κυττάρων υπό συνθήκες οξειδωτικού stress έχει δειχθεί μέσω διαφόρων αλληλεπιδράσεων και σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αποτελεί η δράση της μέσω του συμπλόκου SET στην απόπτωση παθογόνων ή μολυσμένων κυττάρων έπειτα από αύξηση των επιπέδων ROS λόγω συσσώρευσης Granzyme A (Martinvalet *et al.*, 2005). Άλλες περιπτώσεις αφορούν την παρεμπόδιση της ακετυλίωσης του παράγοντα FoxO1 και την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου *p21* (Chae *et al.*, 2014) καθώς και την μεταβολή των επιπέδων φωσφορυλίωσης των Akt και PTEN μέσω αναστολής της PP2A (Leopoldino *et al.*, 2012). Η σύνδεση της SET με την κυτταρική απόκριση στο οξειδωτικό stress επιβεβαιώνεται και από μία πρόσφατη μελέτη όπου η SET χαρακτηρίζεται ως «χωρικός διακόπτης» (spatial switch) και συγκαταλέγεται στην ευρεία κατηγορία πρωτεϊνών-moonlighters, δηλαδή πρωτεϊνών με πολλές λειτουργίες. Η συγκεκριμένη πρωτεομική ανάλυση αναδεικνύει τη συσχέτιση μεταξύ της διαφοράς του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στα υποκυτταρικά διαμερίσματα (υπό συνθήκες stress) και της εκάστοτε λειτουργίας της πρωτεΐνης (Pinto *et al.*, 2018). Συνδυαστικά από τα παραπάνω μπορεί να υποτεθεί ότι η έκθεση των εμβρύων στο FTY720 οδηγεί τα κροσσωτά κύτταρα σε απόπτωση, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες stress, στον οποίο συμμετέχουν οι Seta/b.

### ***Ο ρόλος των Seta/b στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης***

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας *atonal*, είναι βασικοί κατά την εμβρυογένεση και την ανάπτυξη όπου το εύρος των δράσεών τους διαμορφώνεται με χωρο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Καθοριστικό ρόλο σε αυτό παίζει η τοπο-ειδική έκφραση ρυθμιστικών παραγόντων, οι οποίοι προσδένονται στις περιοχές των ενισχυτών γονιδίων-εξαρτώμενων από τους παράγοντες *atonal*, οι οποίοι συνεργούν στη ρύθμιση της μεταγραφής τους (Prasov and Glaser, 2012). Χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα συνιστούν οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές CBP/p300. Έχει δειχθεί ότι η δυνατότητα ενεργοποίησης της έκφρασης γονιδίων από bHLH μεταγραφικούς παράγοντες, σχετίζεται άμεσα με την σύνδεση των πρωτεϊνών CBP/p300 στις αντίστοιχες περιοχές DNA (E-boxes) (Eckner *et al.*, 1996). Ομοίως έχει βρεθεί ότι συμβαίνει και στην περίπτωση του

μεταγραφικού παράγοντα NeuroD1(BETA2) που ανήκει στην οικογένεια *atonal* και έχει διακριτό ρόλο στη νευρική διαφοροποίηση (Sharma *et al.*, 1999). Να σημειωθεί ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα NeuroD, είναι ένα εκ των διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων στο μεταγράφομα των *set morphants* όπου παρουσιάζει μειωμένα επίπεδα έκφρασης.

Δεδομένου ότι η SET αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες CBP/p300 και ρυθμίζει μέσω αυτής της σύνδεσης τη γονιδιακή έκφραση (Karetsou *et al.*, 2005; Shikama *et al.*, 2000), θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η καταστολή της θα διατάρασσε την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων, των οποίων η δράση συνδέεται άμεσα με τις CBP/p300. Επιπλέον, οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες εκτός από συνενεργοποιητές, λειτουργούν και ως ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών, τη δράση των οποίων αναστέλλει η SET ως μέλος του συμπλόκου INHAT (Seo *et al.*, 2001). Στα πλαίσια αυτά, έχει δειχθεί ότι η ακετυλίωση του NeuroD1(BETA2) από την p300, επηρεάζει την μεταγραφική του ενεργότητα (Qiu *et al.*, 2004). Στο zebrafish υπάρχουν δύο γονίδια *crebbp* (*crebbpa* και *crebbpb*) που κωδικοποιούν τις ορθόλογες πρωτεΐνες της CBP. Η ανάλυση του προτύπου έκφρασης των mRNA των δύο γονιδίων κατά την εμβρυογένεση, αποκάλυψε έντονη διάχυτη κατανομή η οποία μέχρι τις 24 hpf είχε περιοριστεί στον οφθαλμό και το ωτικό κυστίδιο (Batut *et al.*, 2015), υποδηλώνοντας βασικό ρόλο των συγκεκριμένων γονιδίων στην διαφοροποίηση αυτών των οργάνων. Το παρόν εύρημα συνδυαστικά αφενός με το αντίστοιχο πρότυπο έκφρασης των *seta/b* και αφετέρου με τη σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ SET και CBP, ενισχύει την υπόθεση της δράσης των υπό μελέτη γονιδίων στη μεταγραφική ρύθμιση παραγόντων που σχετίζονται με τη νευρική διαφοροποίηση, μέσω των CBP/p300.

Σε λειτουργικό επίπεδο ο ρόλος των CBP/p300 στο κεντρικό νευρικό σύστημα συνοδεύεται από τη δράση τους ως ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών μέσω της οποίας ρυθμίζουν επιγενετικά την αύξηση των νευριτών των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Gaub *et al.*, 2010). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση της p300 οδηγεί σε αύξηση των αξόνων των RGCs *in vivo* συνοδευόμενη από αύξηση των επιπέδων ακετυλίωσης της H3K18 (Gaub *et al.*, 2011). Παράλληλα γνωστός είναι ο ρόλος της SET στη φυσιολογική ρύθμιση της αύξησης των αξόνων των RGCs κατά την πρώιμη ανάπτυξη. Μάλιστα καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία αυτή παίζει ο υποκυτταρικός εντοπισμός της SET εφόσον η παρουσία της πρωτεΐνης στον πυρήνα αναστέλλει την αύξηση των νευραξόνων (Trakhtenberg *et al.*, 2014). Βάσει αυτών είναι πιθανόν η



επίδραση της SET εντός του πυρήνα στην αύξηση των αξόνων να αφορά την επιγενετική ρύθμιση παραγόντων που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία, μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει τη δράση των CBP/p300.

### **Η σημασία της έκφρασης των *Seta/b* στα αισθητήρια όργανα του οργανισμού zebrafish**

Συνολικά από την παρούσα μελέτη αναδεικνύεται για πρώτη φορά *in vivo* η λειτουργική σχέση της πρωτεΐνης SET με την ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα συστήματα της πλευρικής γραμμής, της ακοής/ισορροπίας και της όρασης του zebrafish, αποτελούν πρότυπο μελέτης στη βιοϊατρική έρευνα για την διερεύνηση των μηχανισμών που σχετίζονται με σοβαρές παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο, με απώτερο στόχο την ανακάλυψη νέων θεραπειών.

Το σύστημα της πλευρικής γραμμής έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον και αποτελεί αντικείμενο έρευνας σε πολλές τοξικολογικές μελέτες. Βασικός λόγος αξιοποίησης του συστήματος της πλευρικής γραμμής είναι αναγεννητική ικανότητα των κροσσωτών κυττάρων των νευρομαστών έπειτα από επαγόμενη βλάβη λόγω έκθεσης σε ουσίες με τοξική δράση. Η επανεμφάνιση των αισθητήριων κυττάρων εντός 24-36 ωρών μετά την χημικά-επαγόμενη καταστροφή τους, αποδίδεται στην ύπαρξη προγονικών κυττάρων τα οποία αποτελούν ανεξάντλητη πηγή ανάπτυξης νέων αισθητήριων κυττάρων. Επίσης η ύπαρξη πολυδύναμων προγονικών κυττάρων εξασφαλίζει την πλήρη αναγέννηση όλων των κυτταρικών τύπων του νευρομαστού μετά από επαγόμενη βλάβη ακόμη και στα ενήλικα άτομα (Sanchez *et al.*, 2016).

Στο σύστημα της πλευρικής γραμμής δείχθηκε η κατανομή των μεταγράφων *seta/b* στα στηρικτικά κύτταρα των νευρομαστών τα οποία διαφοροποιούνται προς κροσσωτά και εξασφαλίζουν την ικανότητα αναγέννησης αυτών των οργάνων, ενώ παράλληλα βρέθηκε ότι η καταστολή των *seta/b* συνδέεται με τη μείωση της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων που υπαγορεύουν τις διαδικασίες διαφοροποίησης και αναγέννησης των κροσσωτών κυττάρων.

Πέραν των νευρομαστών, τα κροσσωτά κύτταρα αποτελούν τα βασικά μηχανοϋποδοκτικά κύτταρα του έσω ωτός. Ως εκ τούτου, η σωστή ανάπτυξη και λειτουργία τους είναι απαραίτητη για την ακοή και την αίσθηση ισορροπίας. Η επίδραση

παραγόντων όπως αντιβιοτικά, δυνατοί ήχοι και η ηλικία μπορούν να προκαλέσουν σημαντική έως και ανεπανόρθωτη βλάβη στα κροσσωτά κύτταρα οδηγώντας ακόμη και σε απώλεια ακοής.

Η αναζήτηση νέων θεραπειών για την αντιμετώπιση προβλημάτων ακοής έχει πυροδοτήσει πλήθος μελετών με σκοπό τον προσδιορισμό των σηματοδοτικών γεγονότων που ενεργοποιούνται κατά την ανανέωση των κυττάρων και των αλλαγών στο γενετικό τους υπόβαθρο. Στα πλαίσια αυτά, καθοριστικός έχει υπάρξει ο ρόλος του zebrafish ως οργανισμός-μοντέλο εφόσον εκτενείς είναι οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με την αναγέννηση των κροσσωτών κυττάρων αξιοποιώντας κυρίως το σύστημα της πλευρικής γραμμής που εμφανίζει εξαιρετική ομοιότητα ως προς το συγκεκριμένο τύπο κυττάρων με το ακουστικό σύστημα (Edge and Chen, 2008; Whitfield, 2002).

Όσον αφορά το σύστημα της όρασης, σημαντικό πρόβλημα για χιλιάδες ανθρώπους ανά τον κόσμο αποτελούν οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις του αμφιβληστροειδούς. Οι αμφιβληστροειδοπάθειες αφορούν την προοδευτική και μη αναστρέψιμη αλλοίωση των αμφιβληστροειδικών νευρώνων οδηγώντας σε μειωμένη ικανότητα όρασης. Χαρακτηριστικές τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν η μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια, το γλαύκωμα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας.

Η αρχιτεκτονική του αμφιβληστροειδούς διαμορφώνεται πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη και είναι συντηρημένη σε όλους τους σπονδυλωτούς οργανισμούς. Η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των οργανισμών αυτών έγκειται στην αναγεννητική τους ικανότητα καθώς πολλά είδη έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης και αναγέννησης ιστού ως απόκριση σε πιθανή βλάβη κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στα θηλαστικά. Το zebrafish ως ένας τέτοιος οργανισμός έχει τη δυνατότητα αναγέννησης όλων των νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς ακόμη και στην ενήλικη ζωή. Πηγές τροφοδότησης νέων κυττάρων αποτελούν το μελάγχρουν επιθήλιο, η ακτινωτή οριακή ζώνη η οποία βρίσκεται στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς κοντά στον φακό και αποτελείται από βλαστικά κύτταρα και προγονικά κύτταρα και τα γλοιακά κύτταρα Müller (Ail and Perron, 2017; Chiba, 2014; Hamon *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2016).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η σχέση της έκφρασης των *seta/b* με τις ζώνες πολλαπλασιασμού και αναγέννησης του οφθαλμού επιβεβαιώθηκε τόσο σε επίπεδο εντοπισμού στην περιοχή του RPE και της CMZ όσο και σε επίπεδο

μεταγραφώματος με τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων. Χαρακτηριστικά, το *atoh7*, το γονίδιο με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στα morphants, έχει δειχθεί ότι εκφράζεται στα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα της CMZ όπως και στα γλοιακά κύτταρα Müller (Lust *et al.*, 2016). Επίσης, μειωμένα βρέθηκαν στα *set* morphants τα επίπεδα του *rx2* (Παράρτημα 4, Πίνακας 1). Το εν λόγω γονίδιο κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Rx2 (Retinal homeobox 2) ο οποίος εκφράζεται στα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (Loosli *et al.*, 2001).

Συνδυαστικά, από τα παραπάνω αναδεικνύεται ο ρόλος των δύο γονιδίων *seta* και *setb* στη ανάπτυξη του αισθητήριου νευρικού συστήματος και ειδικότερα στη νευρογένεση και τη νευρική διαφοροποίηση. Περαιτέρω μελέτη του ρόλου των *Seta/b* στη διαφοροποίηση και την αναγέννηση των αισθητήριων οργάνων στο zebrafish, θα συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων οι δύο πρωτεΐνες ασκούν τη δράση τους.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η SET είναι μια ογκοπρωτεΐνη η οποία ταυτοποιήθηκε στα πλαίσια μελέτης χρωμοσωμικών μεταθέσεων σε διάφορους τύπους λευχαιμίας. Η φωσφοπρωτεΐνη SET έχει μοριακό βάρος 39 kDa, κατανέμεται κυρίως στον πυρήνα ωστόσο, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, μπορεί να μετακινηθεί στο κυτταρόπλασμα και στην πλασματική μεμβράνη. Είναι εξελικτικά συντηρημένη και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και τους τύπους κυττάρων. Πρόκειται για μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη, η οποία εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης, στη γονιδιακή έκφραση, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση και στην κυτταρική μετανάστευση. Χαρακτηριστική είναι η δράση της ως αναστολέας της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A). Αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στο ρόλο της SET στο νευρικό σύστημα και στη νόσο Alzheimer. Επίσης, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου, γεγονός που έχει πυροδοτήσει νέες έρευνες προς την κατεύθυνση αξιοποίησής της ως μόριο-στόχο στη θεραπεία κατά του καρκίνου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση και η κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου της SET σε επίπεδο οργανισμού. Ως εκ τούτου, μελετήθηκε η ορθόλογη πρωτεΐνη στο zebrafish. Στον οργανισμό zebrafish απαντώνται δύο παράλογα γονίδια, προϊόντα των οποίων είναι οι πρωτεΐνες Seta και Setb. Οι Seta/b παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλό ποσοστό ομολογίας τόσο μεταξύ τους όσο και με την ανθρώπινη ορθόλογη. Η ανάλυση του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης των γονιδίων *seta* και *setb* σε έμβρυα και προνύμφες έδειξε ότι τα μετάγραφα των δύο γονιδίων παρουσιάζουν όμοια κατανομή στο όριο μεσεγκεφάλου-οπίσθιου εγκεφάλου, στο μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς, στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων και την ακτινωτή οριακή ζώνη των οφθαλμών, στις αισθητήριες δομές του ωτικού κυστιδίου και στους νευρομαστούς της πλευρικής γραμμής. Ομοίως, πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι των Seta/b, έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Seta και Setb εντοπίζονται στους οφθαλμούς, στο οσφρητικό επιθήλιο και στα κροσσωτά κύτταρα των νευρομαστών, αναδεικνύοντας συνολικά την έκφραση των γονιδίων *set* στα αισθητήρια όργανα του zebrafish.

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των γονιδίων έγινε μέσω πειραμάτων καταστολής έκφρασης αξιοποιώντας τη μέθοδο των αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων μορφολίνης

και του συστήματος CRISPR-Cas9. Η στόχευση των δύο γονιδίων *seta* και *setb* μέσω χρήσης ειδικού ολιγομερούς με δράση παρεμπόδισης μετάφρασης (MOab), προκάλεσε αύξηση των επιπέδων απόπτωσης, μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και οδήγησε στην ανάπτυξη μορφολογικών αλλαγών. Μέσω συνδυαστικής έγχυσης MOab και mRNA του ανθρώπινου γονιδίου *SET* επετεύχθη μερική ανάκτηση του προκαλούμενου φαινοτύπου. Αντίστοιχες ήταν οι παρατηρήσεις που προήλθαν τόσο από τη χρήση ενός αντινοσηματικού ολιγομερούς με διαφορετικό μηχανισμό δράσης (παρεμπόδιση μεταγραφής, MOb) όσο και μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9.

Σε επίπεδο λειτουργίας, η μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών *Seta/b* οδήγησε σε μείωση του αριθμού των ενεργών νευρομαστών, όπως διαπιστώθηκε έπειτα από *in vivo* χρώση των morphants με τη φθορίζουσα ουσία FM1-43. Στο ίδιο αποτέλεσμα οδήγησε η καταστολή του *setb* μέσω έγχυσης του ολιγομερούς MOb ή του gRNA/Cas9. Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και μέσω φαρμακολογικής αναστολής των *Seta/b*, έπειτα από έκθεση των εμβρύων στο φάρμακο FTY720. Συνδυαστικά, μέσω εναλλακτικών μεθόδων, αποδείχθηκε η λειτουργική συσχέτιση των *Seta/b* με τα κροσσωτά κύτταρα των νευρομαστών. Ταυτόχρονα, η σημαντική αύξηση των εστιών απόπτωσης στα κροσσωτά κύτταρα του αυτιού και των νευρομαστών, λόγω γονιδιακής καταστολής ή φαρμακολογικής αναστολής, ενίσχυσε τη σχέση των πρωτεϊνών με τα αισθητήρια αυτά κύτταρα.

Η ανάλυση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης των morphants ανέδειξε την ύπαρξη διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων τα οποία μέσω ρύθμισης της μεταγραφής, επηρεάζουν τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των οργάνων του αισθητήριου συστήματος. Χαρακτηριστικές είναι οι περιπτώσεις των γονιδίων *atonal* που κωδικοποιούν προνευρικούς μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνους για τη διαφοροποίηση των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς και των κροσσωτών κυττάρων της πλευρικής γραμμής και του αυτιού.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη εργασία, συνδέουν για πρώτη φορά την δράση των γονιδίων *seta* και *setb* με την εμβρυογένεση και την ανάπτυξη των οργάνων του αισθητήριου συστήματος.

## SUMMARY

SET oncoprotein was originally identified in the context of chromosome translocation studies in various types of leukemia. SET is a 39 kDa phosphoprotein distributed predominantly in the nucleus but it also translocates to the cytoplasm and the plasma membrane. It is an evolutionarily conserved protein that is widely expressed in all cell types and tissues. SET is a multifunctional protein implicated in diverse cellular processes including chromatin remodelling, gene expression, cell cycle regulation, apoptosis and migration. Importantly, SET is a potent inhibitor of the tumor suppressor protein phosphatase 2A (PP2A). Several studies have focused on the role of SET in the nervous system and the development of Alzheimer's disease. It has also been shown that SET is involved in the development of various types of cancer, which has led to new studies towards its use as a target in cancer treatment.

The aim of this work was to understand the physiological roles of SET at the organismal level focusing on the zebrafish orthologs. In zebrafish there are two paralog genes coding for *Seta* and *Setb* proteins which share high homology with their human counterpart.

*In situ* hybridization experiments revealed similar expression patterns for *seta* and *setb* genes. Both transcripts exhibited a uniform distribution at the midbrain-hindbrain boundary, the retinal pigment epithelium, the ganglion cell layer and the ciliary marginal zone, as well as, the sensory hair cells of the otic vesicle and the lateral line neuromasts. Whole mount immunofluorescence experiments using an antibody that recognizes both proteins, also showed increased staining in the eyes, the olfactory epithelium and the hair cells of the lateral line system. Taken together, these data provide a first link between the spatiotemporal expression profiles of these genes and the development of the sensory organs of zebrafish.

Loss-of-function studies using antisense morpholino oligonucleotides targeting both *seta* and *setb* genes (MOab), resulted in increased apoptosis, reduced cell proliferation and morphological defects. The morphant phenotypes were partially rescued when MOab was co-injected with the human *SET* mRNA. Similar phenotypic defects were observed upon knockdown of *setb* with a transcription-blocking morpholino oligonucleotide (MOb) or by *setb* gRNA /Cas9 injections.

Moreover, *in vivo* labeling of hair cells using the fluorescent styryl-dye FM1-43, showed a significantly decreased number of active neuromasts in MOab-, MOb- and gRNA/Cas9-injected embryos. The effects of the pharmacological inhibition of Seta/b with the sphingosine analog FTY720 were in accordance with the previous data, further supporting the functional correlation of Seta/b with these mechanoreceptive organs. In line with this, increased apoptosis was also detected in the hair cells of the neuromasts and otic vesicle upon *seta/b* knockdown or drug- mediated inhibition.

Microarray analysis of the MOab transcriptome revealed differential expression in networks controlling gene transcription in the sensory organs. Amongst the most affected were the *atonal* genes. These encode proneural transcription factors required for differentiation of the retinal ganglion cells and of the hair cells present in the ear and the lateral line system. Collectively, the present work provides new insights on the physiological roles of *seta* and *setb* genes and shows for the first time that their functions are essential for embryonic and sensory system development.



## ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

**Ακτινωτό σώμα** (ciliary body): είναι κυκλικός ιστός μέσα στο μάτι, που αποτελείται από τον ακτινωτό μυ και τις ακτινωτές αποφύσεις. Αποτελεί τμήμα του ραγοειδούς χιτώνα, του στρώματος του βολβού που τρέφει το μάτι μεταφέροντας θρεπτικές ουσίες.

**αλληλόμορφα** (alleles): γονίδια με εναλλακτικές αλληλουχίες DNA που καταλαμβάνουν τον ίδιο γενετικό τόπο

**αναδίπλωση** (involution): είσοδος μιας κυτταρικής στιβάδας στο εσωτερικό του εμβρύου μέσω κίνησης που καθοδηγείται από ελεύθερο άκρο

**ανάδρομη γενετική ανάλυση** (reverse genetics): μελέτη της λειτουργίας ενός γνωστού γονιδίου με γενετικές μεθόδους όπως η δημιουργία μεταλλαγμάτων απώλειας λειτουργίας

**απαγωγοί νευρώνες** (efferent neurons): παράγουν τις ώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα (κινητικά νεύρα) και μεταφέρουν κινητικά σήματα προς τα εσωτερικά όργανα.

**ασυμμετρία δεξιά-αριστερά** (left-right asymmetry): οι διαφορές ανάμεσα στην αριστερή και τη δεξιά πλευρά του σώματος ως προς τη γονιδιακή έκφραση, τις μορφογενετικές κινήσεις, τη διαφοροποίηση ή τη μορφολογία.

**αυγό** (egg): ο θηλυκός γαμέτης μετά την ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης (δηλαδή το ωάριο). Ωστόσο έτσι ονομάζεται συχνά και το γονιμοποιημένο ωάριο (δηλαδή το ζυγωτό). Ο όρος μπορεί να αναφέρεται επίσης και σε δευτερογενή ωοκύτταρα ή και πρώιμα έμβρυα.

**αυλάκωση** (cleavage): τύπος κυτταρικής διαίρεσης που δεν συνοδεύεται από κυτταρική αύξηση, οπότε τα θυγατρικά κύτταρα είναι μικρότερα από τα μητρικά. Απαντάται κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των οργανισμών.

**Βασική μεμβράνη** (basement membrane): στιβάδα εξωκυττάριου στρώματος που αποτελεί τη βάση του επιθηλιακού ιστού.

**βλαστίδιο** (blastula): καλείται το έμβρυο κατά τη διάρκεια του πρώιμου αναπτυξιακού σταδίου της αυλάκωσης. Έχει σφαιρική δομή και αποτελείται από όμοια κύτταρα που προκύπτουν από την επανειλημμένη αυλάκωση του γονιμοποιημένου ωαρίου.

**βλαστικές στιβάδες** (germ layers): το ενδόδερμα, το μεσόδερμα και το εξώδερμα.

**βλαστόδερμα** (blastoderm): καλείται το έμβρυο κατά τη διάρκεια του πρώιμου αναπτυξιακού σταδίου της αυλάκωσης. Είναι όμοιο με το βλαστίδιο αλλά στο βλαστόδερμα τα κύτταρα είναι διαταγμένα σε στιβάδα και όχι σε σφαίρα.

**βλαστομερή** (blastomeres): τα μεγάλα κύτταρα που προκύπτουν από το γονιμοποιημένο ωάριο μέσω των διαιρέσεων της αυλάκωσης.

**βραγχιακά τόξα** (ή φαρυγγικά τόξα, branchial arches): μεταμερικές δομές που εντοπίζονται ανάμεσα στους φαρυγγικούς θύλακες. Κάθε φαρυγγικό τόξο περιλαμβάνει ένα χόνδρινο τόξο, ένα αιμοφόρο αγγείο και ένα κρανιακό νευρο.

**Γάγγλιο** (ganglion): δομή του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος που περιέχει νευρώνες.

**γαστρίδιωση** (gastrulation): στάδιο της πρώιμης ανάπτυξης που περιλαμβάνει σειρά μορφογενετικών κινήσεων και οδηγεί στο σχηματισμό των τριών βλαστικών στιβάδων. Το έμβρυο σε αυτό το στάδιο καλείται γαστρίδιο (gastrula).

**γονάδα** (gonad): η σωματική δομή που περιέχει κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς.

**γονότυπος** (genotype): ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει το σύνολο των αλληλόμορφων γονιδίων ενός οργανισμού.

**Δέσμευση** (commitment): αναφέρεται σε ένα κύτταρο ή μια περιοχή που έχει προγραμματιστεί να ακολουθήσει ένα συγκεκριμένο αναπτυξιακό μονοπάτι ή πεπρωμένο.

**διαφοροποίηση** (differentiation): η διαδικασία κατά την οποία ένα κύτταρο αποκτά τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του. Ο όρος συνήθως αναφέρεται στο τελευταίο βήμα της ανάπτυξης και όχι στα πιο πρώιμα γεγονότα της δέσμευσης.

**διεγκέφαλος** (diencephalon): το οπίσθιο τμήμα του πρόσθιου εγκεφάλου των σπονδυλωτών.

**Εγκόλπωση** (invagination): αναδίπλωση προς το εσωτερικό μιας κυτταρικής στιβάδας (του εμβρύου ή μιας δομής) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας εσωτερικής προεξοχής ή ενός θύλακα.

**εδωφιαίο πέταλο** (floor plate): το μέσο κοιλιακό τμήμα του νωτιαίου μυελού του εμβρύου των σπονδυλωτών

**εμβρυϊκή επαγωγή** (embryonic induction): η διαδικασία μέσω της οποίας η ανάπτυξη μιας ομάδας κυττάρων (που ονομάζεται δεκτική) τροποποιείται από έναν επαγωγικό παράγοντα ο οποίος συντίθεται από μια άλλη ομάδα κυττάρων (που ονομάζεται σηματοδοτικό κέντρο).

**επιβολή** (epiboly): ενεργή επέκταση και αύξηση της επιφάνειας μιας στιβάδας κυττάρων.

**Ζυγωτό** (zygote): το γονιμοποιημένο αυγό ύστερα από το στάδιο της σύντηξης του αρσενικού προπυρήνα με τον θηλυκό.

**Καταβολή ουράς** (tail bud): (1) περιοχή στο οπίσθιο τμήμα ενός εμβρύου σπονδυλωτών από την οποία αναπτύσσεται η ουρά, (2) το φυλοτυπικό στάδιο των εμβρύων των σπονδυλωτών.

**κεντρικός** (proximal): που είναι πιο κοντά στο σώμα.

**κλοάκη** (cloaca): κοινό ουρογενετικό και πρωκτικό άνοιγμα.

**κοιλιακό** (ventral): το κατώτερο τμήμα ενός οργανισμού, που φέρει το στόμα.

**κύτταρα γλοίας** (glial cells): μη νευρωνικά κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος.

**κυτταροπλασματικός καθοριστής** (cytoplasmic determinant): μόριο που εντοπίζεται σε ένα τμήμα του ωαρίου ή ενός βλαστομερούς και προσδίδει στα κύτταρα που το κληρονομούν συγκεκριμένη αναπτυξιακή δέσμευση.

**Λέκιθος** (yolk): κοκκία τροφικού αποθέματος που αποτίθενται στο ωοκύτταρο και χρησιμοποιούνται για τη θρέψη του εμβρύου. Τα κοκκία λεκίθου περιέχουν ορισμένες βασικές πρωτεΐνες καθώς και λιπίδια.

**Μελάχρον επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς** (retinal pigment epithelium): έγχρωμη στιβάδα του οφθαλμού που αναπτύσσεται από το οπτικό κυστίδιο.

**μεσεγκέφαλος** (midbrain): περιοχή του εμβρυϊκού εγκεφάλου των σπονδυλωτών από την οποία αναπτύσσονται τα τετράδυμα ή οι ισοδύναμες δομές τους

**μορφογένεση** (morphogenesis): το σύνολο των μηχανισμών που περιλαμβάνουν μετακίνηση κυττάρων ή κυτταρικών στιβάδων και οδηγούν στον σχηματισμό διαφόρων δομών.

**Νευριδίωση** (neurulation): στάδιο της ανάπτυξης των σπονδυλωτών κατά το οποίο λαμβάνουν χώρα οι μορφογενετικές κινήσεις που οδηγούν στο σχηματισμό αρχικά της νευρικής πλάκας και τελικά του νευρικού σωλήνα.

**νευρική ακρολοφία** (neural crest): παροδικός πληθυσμός πολυδύναμων μεταναστευτικών κυττάρων από τον ραχιαίο νευρικό σωλήνα των εμβρύων των σπονδυλωτών.

**νευρική πλάκα** (neural plate): επίπεδη στιβάδα νευροεπιθηλίου από την οποία σχηματίζεται ο νευρικός σωλήνας των εμβρύων των σπονδυλωτών.

**νευρικός σωλήνας** (neural tube): η καταβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών.

**νευρογένεση** (neurogenesis): η διαδικασία σχηματισμού των νευρώνων.

**νωτοχορδή** (notochord): δομή που απαντάται στα έμβρυα των χορδωτών. Αποτελεί παράγωγο του πλέον ραχιαίου τμήματος του μεσοδέρματος, ιστολογικά μοιάζει με χόνδρο και έχει σχήμα ράβδου.

**Ομόλογα** (homolog): έτσι χαρακτηρίζονται τα γονίδια όταν οι αλληλουχίες τους εμφανίζουν ομοιότητες επειδή κατάγονται από μια κοινή προγονική αλληλουχία.

**οπίσθιος εγκέφαλος** (hindbrain): περιοχή του εγκεφάλου των εμβρύων των σπονδυλωτών από την οποία αναπτύσσεται η παρεγκεφαλίδα και ο προμήκης μυελός.

**οργανογένεση** (organogenesis): η διαδικασία ή το στάδιο του σχηματισμού των μεμονωμένων οργάνων κατά την ανάπτυξη των σπονδυλωτών.

**οργανωτής** (σηματοδοτικό κέντρο, organizer): ομάδα κυττάρων που παράγουν έναν επαγωγικό παράγοντα.

**ορθόδρομη γενετική ανάλυση** (forward genetics): ανάλυση ενός βιολογικού φαινομένου αρχίζοντας από έναν μεταλλαγμένο φαινότυπο.

**οφθαλμικά κυστίδια** (optic cup, optic vesicle): αποφύσεις του πρόσθιου εγκεφάλου του εμβρύου των σπονδυλωτών από τις οποίες σχηματίζονται οι οφθαλμοί.

**Παράλογα** (paralog): έτσι χαρακτηρίζονται τα γονίδια φέρουν όμοιες αλληλουχίες εντός του ίδιου γονιδιώματος τα οποία προκύπτουν συνήθως από γεγονότα γονιδιακού διπλασιασμού.

**παρεγκεφαλίδα** (cerebellum): τμήμα του εγκεφάλου των σπονδυλωτών το οποίο ελέγχει την κίνηση και αναπτύσσεται από το ρομβομερές 1 του οπίσθιου εγκεφάλου.

**περιφερικός** (distal): όργανο ή δομή που είναι πιο απομακρυσμένο από το σώμα.

**πλακώδιο** (placode): πάχυνση της επιδερμίδας που αποτελεί καταβολή μιας δομής, συνήθως ενός αισθητήριου οργάνου.

**πλευρική αναστολή** (lateral inhibition): μηχανισμός τοπικής εξειδίκευσης που περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση μεμονωμένων κυττάρων ή συστάδων κυττάρων προς μία συγκεκριμένη κατεύθυνση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής από ένα κύτταρο ενός επαγωγικού παράγοντα που παρεμποδίζει τα παρακείμενα κύτταρα να ακολουθήσουν το ίδιο αναπτυξιακό μονοπάτι.

**προγονικό κύτταρο** (progenitor cell): διαιρούμενο κύτταρο το οποίο σε αντίθεση με το βλαστικό κύτταρο, δεν μπορεί να διαιρείται επ' αορίστου. Από τα προγονικά κύτταρα προκύπτει ένας πληθυσμός διαφοροποιημένων κυττάρων, συνήθως εντός ενός ιστού ή οργάνου.

**πρόδρομο κύτταρο** (precursor cell): το κύτταρο που έχει ολοκληρώσει την τελική του μίτωση και έχει δεσμευτεί (committed) προς συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, όμως δεν έχει ακόμη διαφοροποιηθεί.

**προνευρική συστάδα** (proneural cluster): ομάδα κυττάρων που είναι δεκτικά ως προς το σχηματισμό νευρώνων. Ωστόσο μόνο ένα από αυτά διαφοροποιείται σε νευρικό λόγω πλευρικής αναστολής.

**προσαγωγές νευρικές ίνες** (afferent nerve fibres): ίνες που άγουν τις ώσεις προς το κεντρικό νευρικό σύστημα. Σχετίζονται με την προσαγωγή των πληροφοριών από τους αισθητήριους υποδοχείς.

**πρόσθιος εγκέφαλος** (forebrain): περιοχή του εγκεφάλου των σπονδυλωτών από την οποία αναπτύσσεται ο τελεγκέφαλος και ο διεγκέφαλος.

**Ρομβομερή** (rhombomeres): παροδικές μεταμερικές δομές στον οπίσθιο εγκέφαλο του εμβρύου των σπονδυλωτών.

**Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων** (knockout): μεθοδολογία με την οποία δημιουργείται εκμηδενιστικό μετάλλαγμα μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης.

**σωμίτες** (somites): μεταμερικά οργανωμένες δομές μεσοδερμικής προέλευσης των εμβρύων των σπονδυλωτών από τις οποίες αναπτύσσονται, μεταξύ άλλων, οι σπόνδυλοι και οι γραμμωτοί μύες.

**Τελεγκέφαλος** (telencephalon): το εμπρόσθιο τμήμα του πρόσθιου εγκεφάλου των σπονδυλωτών.

**τετράδυμο** (optic tectum): περιοχή του μεσεγκεφάλου όπου απολήγουν οι νευράξονες του οπτικού νεύρου.

**Φαινότυπος** (phenotype): τα συνολικά μορφολογικά χαρακτηριστικά ενός οργανισμού. Καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το γονότυπο του ατόμου.

**Ωτικό πλακώδιο** (otic placode): δομή επιδερμικής προέλευσης από την οποία σχηματίζονται τα κυστίδια των ωτών.

**ωτόλιθοι** (otoliths): κρύσταλλοι ανθρακικού ασβεστίου, εναποτίθενται στις ακουστικές κηλίδες του έσω ωτός.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adachi, Y., Pavlakis, G. N. and Copeland, T. D. (1994). Identification of in vivo phosphorylation sites of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation breakpoint in acute undifferentiated leukemia. *FEBS Lett.* **340**, 231-235.

Agarwal, A., MacKenzie, R. J., Pippa, R., Eide, C. A., Oddo, J., Tyner, J. W., *et al.* (2014). Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* **20**, 2092-2103.

Ail, D. and Perron, M. (2017). Retinal Degeneration and Regeneration-Lessons From Fishes and Amphibians. *Curr Pathobiol Rep.* **5**, 67-78.

Al-Bassam, J. and Corbett, K. D. (2012). alpha-Tubulin acetylation from the inside out. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 19515-19516.

Al-Murrani, S. W., Woodgett, J. R. and Damuni, Z. (1999). Expression of I2PP2A, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c-Jun and AP-1 activity. *Biochem J.* **341** ( Pt 2), 293-298.

Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P. and Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Res C Embryo Today.* **93**, 115-133.

Aman, A. and Piotrowski, T. (2011). Cell-cell signaling interactions coordinate multiple cell behaviors that drive morphogenesis of the lateral line. *Cell Adh Migr.* **5**, 499-508.

Anastasiadou, S. and Knoll, B. (2016). The multiple sclerosis drug fingolimod (FTY720) stimulates neuronal gene expression, axonal growth and regeneration. *Exp Neurol.* **279**, 243-260.

Arif, M., Wei, J., Zhang, Q., Liu, F., Basurto-Islas, G., Grundke-Iqbal, I., *et al.* (2014). Cytoplasmic retention of protein phosphatase 2A inhibitor 2 (I2PP2A) induces Alzheimer-like abnormal hyperphosphorylation of Tau. *J Biol Chem.* **289**, 27677-27691.

Arnaud, L., Chen, S., Liu, F., Li, B., Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., *et al.* (2011). Mechanism of inhibition of PP2A activity and abnormal hyperphosphorylation of tau by I2(PP2A)/SET. *FEBS Lett.* **585**, 2653-2659.

Arriazu, E., Pippa, R. and Odero, M. D. (2016). Protein Phosphatase 2A as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol.* **6**, 78.

Avanesov, A. and Malicki, J. (2010). Analysis of the retina in the zebrafish model. *Methods Cell Biol.* **100**, 153-204.

Bali, J., Halima, S. B., Felmy, B., Goodger, Z., Zurbriggen, S. and Rajendran, L. (2010). Cellular basis of Alzheimer's disease. *Ann Indian Acad Neurol.* **13**, S89-93.

- Batut, J., Duboe, C. and Vandiel, L. (2015). Expression patterns of CREB binding protein (CREBBP) and its methylated species during zebrafish development. *Int J Dev Biol.* **59**, 229-234.
- Bauer, N. C., Doetsch, P. W. and Corbett, A. H. (2015). Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic.* **16**, 1039-1061.
- Bedell, V. M., Westcot, S. E. and Ekker, S. C. (2011). Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Brief Funct Genomics.* **10**, 181-188.
- Beresford, P. J., Zhang, D., Oh, D. Y., Fan, Z., Greer, E. L., Russo, M. L., *et al.* (2001). Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem.* **276**, 43285-43293.
- Berkovits, B. D. and Mayr, C. (2015). Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization. *Nature.* **522**, 363-367.
- Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., *et al.* (1999). Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science.* **284**, 1837-1841.
- Bever, M. M. and Fekete, D. M. (2002). Atlas of the developing inner ear in zebrafish. *Dev Dyn.* **223**, 536-543.
- Bill, B. R., Petzold, A. M., Clark, K. J., Schimmenti, L. A. and Ekker, S. C. (2009). A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish.* **6**, 69-77.
- Bishop, A. L. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* **348 Pt 2**, 241-255.
- Bleckmann, H. and Zelik, R. (2009). Lateral line system of fish. *Integr Zool.* **4**, 13-25.
- Blum, M., De Robertis, E. M., Wallingford, J. B. and Niehrs, C. (2015). Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Dev Cell.* **35**, 145-149.
- Bontems, F., Fish, R. J., Borlat, I., Lembo, F., Chocu, S., Chalmel, F., *et al.* (2014). C2orf62 and TTC17 are involved in actin organization and ciliogenesis in zebrafish and human. *PLoS One.* **9**, e86476.
- Brennan, C. M., Gallouzi, I. E. and Steitz, J. A. (2000). Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol.* **151**, 1-14.
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., *et al.* (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* **9**, 883-897.
- Brown, N. L., Patel, S., Brzezinski, J. and Glaser, T. (2001). Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation. *Development.* **128**, 2497-2508.



- Cai, C., Lin, J., Sun, S. and He, Y. (2016). JNK Inhibition Inhibits Lateral Line Neuromast Hair Cell Development. *Front Cell Neurosci.* **10**, 19.
- Cai, T. and Groves, A. K. (2015). The Role of Atonal Factors in Mechanosensory Cell Specification and Function. *Mol Neurobiol.* **52**, 1315-1329.
- Canela, N., Rodriguez-Vilarrupla, A., Estanyol, J. M., Diaz, C., Pujol, M. J., Agell, N., *et al.* (2003). The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J Biol Chem.* **278**, 1158-1164.
- Carlson, S. G., Eng, E., Kim, E. G., Perlman, E. J., Copeland, T. D. and Ballermann, B. J. (1998). Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. *J Am Soc Nephrol.* **9**, 1873-1880.
- Cervoni, N., Detich, N., Seo, S. B., Chakravarti, D. and Szyf, M. (2002). The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. *J Biol Chem.* **277**, 25026-25031.
- Chae, Y. C., Kim, K. B., Kang, J. Y., Kim, S. R., Jung, H. S. and Seo, S. B. (2014). Inhibition of FoxO1 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-1beta induces p21 transcription. *FEBS Lett.* **588**, 2867-2873.
- Chakravarti, D. and Hong, R. (2003). SET-ting the stage for life and death. *Cell.* **112**, 589-591.
- Chambon, J. P., Touati, S. A., Berneau, S., Cladiere, D., Hebras, C., Groeme, R., *et al.* (2013). The PP2A inhibitor I2PP2A is essential for sister chromatid segregation in oocyte meiosis II. *Curr Biol.* **23**, 485-490.
- Chen, J., Martin, B. L. and Brautigan, D. L. (1992). Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science.* **257**, 1261-1264.
- Chiba, C. (2014). The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration. *Exp Eye Res.* **123**, 107-114.
- Choksi, S. P., Lauter, G., Swoboda, P. and Roy, S. (2014). Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Development.* **141**, 1427-1441.
- Chowdhury, D., Beresford, P. J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J. S., Demple, B., *et al.* (2006). The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell.* **23**, 133-142.
- Christensen, D. J., Chen, Y., Oddo, J., Matta, K. M., Neil, J., Davis, E. D., *et al.* (2011). SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood.* **118**, 4150-4158.

- Chun, J. and Brinkmann, V. (2011). A mechanistically novel, first oral therapy for multiple sclerosis: the development of fingolimod (FTY720, Gilenya). *Discov Med.* **12**, 213-228.
- Compagnone, N. A., Zhang, P., Vigne, J. L. and Mellon, S. H. (2000). Novel role for the nuclear phosphoprotein SET in transcriptional activation of P450c17 and initiation of neurosteroidogenesis. *Mol Endocrinol.* **14**, 875-888.
- Dai, X. N., Liu, S., Shao, L., Gao, C., Gao, L., Liu, J. Y., *et al.* (2014). Expression of the SET protein in testes of mice at different developmental stages. *Asian J Androl.* **16**, 689-693.
- Dambly-Chaudiere, C., Cubedo, N. and Ghysen, A. (2007). Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev Biol.* **7**, 23.
- Dambly-Chaudiere, C., Sapede, D., Soubiran, F., Decorde, K., Gompel, N. and Ghysen, A. (2003). The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biol Cell.* **95**, 579-587.
- De Strooper, B. and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell.* **164**, 603-615.
- Dong, L., Zhu, J., Wen, X., Jiang, T. and Chen, Y. (2014). Involvement of SET in the Wnt signaling pathway and the development of human colorectal cancer. *Oncol Lett.* **7**, 1203-1208.
- Eckner, R., Yao, T. P., Oldread, E. and Livingston, D. M. (1996). Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev.* **10**, 2478-2490.
- Edge, A. S. and Chen, Z. Y. (2008). Hair cell regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* **18**, 377-382.
- Eisen, J. S. and Smith, J. C. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development.* **135**, 1735-1743.
- Eitoku, M., Sato, L., Senda, T. and Horikoshi, M. (2008). Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. *Cell Mol Life Sci.* **65**, 414-444.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* **35**, 495-516.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A. and Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish.* **4**, 21-40.
- Estanyol, J. M., Jaumot, M., Casanovas, O., Rodriguez-Vilarrupla, A., Agell, N. and Bachs, O. (1999). The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity. *J Biol Chem.* **274**, 33161-33165.

- Fadool, J. M. and Dowling, J. E. (2008). Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. *Prog Retin Eye Res.* **27**, 89-110.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. and Lieberman, J. (2003a). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell.* **112**, 659-672.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D. and Lieberman, J. (2002). HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Mol Cell Biol.* **22**, 2810-2820.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D., Xu, Z., Novina, C. D., Yoshida, A., *et al.* (2003b). Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol.* **4**, 145-153.
- Favre, B., Zolnierowicz, S., Turowski, P. and Hemmings, B. A. (1994). The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J Biol Chem.* **269**, 16311-16317.
- Fischer, A. J., Bosse, J. L. and El-Hodiri, H. M. (2014). Reprint of: the ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Exp Eye Res.* **123**, 115-120.
- Flegg, C. P., Sharma, M., Medina-Palazon, C., Jamieson, C., Galea, M., Brocardo, M. G., *et al.* (2010). Nuclear export and centrosome targeting of the protein phosphatase 2A subunit B56alpha: role of B56alpha in nuclear export of the catalytic subunit. *J Biol Chem.* **285**, 18144-18154.
- Fuentes, R. and Fernandez, J. (2010). Ooplasmic segregation in the zebrafish zygote and early embryo: pattern of ooplasmic movements and transport pathways. *Dev Dyn.* **239**, 2172-2189.
- Gallouzi, I. E., Brennan, C. M. and Steitz, J. A. (2001). Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA.* **7**, 1348-1361.
- Gama-Carvalho, M. and Carmo-Fonseca, M. (2001). The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins. *FEBS Lett.* **498**, 157-163.
- Gaub, P., Joshi, Y., Wuttke, A., Naumann, U., Schnichels, S., Heiduschka, P., *et al.* (2011). The histone acetyltransferase p300 promotes intrinsic axonal regeneration. *Brain.* **134**, 2134-2148.
- Gaub, P., Tedeschi, A., Puttagunta, R., Nguyen, T., Schmandke, A. and Di Giovanni, S. (2010). HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. *Cell Death Differ.* **17**, 1392-1408.

- Gerhard, G. S., Kauffman, E. J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J. L., Kasales, C. J., *et al.* (2002). Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol.* **37**, 1055-1068.
- Gestri, G., Link, B. A. and Neuhauss, S. C. (2012). The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases. *Dev Neurobiol.* **72**, 302-327.
- Ghiasvand, N. M., Rudolph, D. D., Mashayekhi, M., Brzezinski, J. A. t., Goldman, D. and Glaser, T. (2011). Deletion of a remote enhancer near ATOH7 disrupts retinal neurogenesis, causing NCRNA disease. *Nat Neurosci.* **14**, 578-586.
- Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol.* **14**, 67-73.
- Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (2007). The lateral line microcosmos. *Genes Dev.* **21**, 2118-2130.
- Glasauer, S. M. and Neuhauss, S. C. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol Genet Genomics.* **289**, 1045-1060.
- Guo, H. and Damuni, Z. (1993). Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 2500-2504.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., *et al.* (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development.* **123**, 1-36.
- Hait, N. C., Wise, L. E., Allegood, J. C., O'Brien, M., Avni, D., Reeves, T. M., *et al.* (2014). Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat Neurosci.* **17**, 971-980.
- Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J.* **27**, 589-605.
- Hamon, A., Roger, J. E., Yang, X. J. and Perron, M. (2016). Muller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems. *Dev Dyn.* **245**, 727-738.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**, 646-674.
- Hansen, J. C., Nyborg, J. K., Luger, K. and Stargell, L. A. (2010). Histone chaperones, histone acetylation, and the fluidity of the chromog genome. *J Cell Physiol.* **224**, 289-299.
- Head, J. R., Gacioch, L., Pennisi, M. and Meyers, J. R. (2013). Activation of canonical Wnt/beta-catenin signaling stimulates proliferation in neuromasts in the zebrafish posterior lateral line. *Dev Dyn.* **242**, 832-846.

- Heggen, M. A. and Bradley, R. S. (2003). The cytoplasmic domain of Xenopus NF-protocadherin interacts with TAF1/set. *Dev Cell*. **4**, 419-429.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W. and Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci*. **86**, 6-19.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., *et al.* (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. **496**, 498-503.
- Hung, M. C. and Link, W. (2011). Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci*. **124**, 3381-3392.
- Hunter, C. S., Malik, R. E., Witzmann, F. A. and Rhodes, S. J. (2013). LHX3 interacts with inhibitor of histone acetyltransferase complex subunits LANP and TAF-1beta to modulate pituitary gene regulation. *PLoS One*. **8**, e68898.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C. X. and Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. **7**, 656-664.
- Irie, A., Harada, K., Araki, N. and Nishimura, Y. (2012). Phosphorylation of SET protein at Ser171 by protein kinase D2 diminishes its inhibitory effect on protein phosphatase 2A. *PLoS One*. **7**, e51242.
- Itoh, M. and Chitnis, A. B. (2001). Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. *Mech Dev*. **102**, 263-266.
- Jackson, S. P. and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. **461**, 1071-1078.
- Janghorban, M., Farrell, A. S., Allen-Petersen, B. L., Pelz, C., Daniel, C. J., Oddo, J., *et al.* (2014). Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **111**, 9157-9162.
- Janssens, V. and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*. **353**, 417-439.
- Jao, L. E., Wentz, S. R. and Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**, 13904-13909.
- Jarman, A. P. and Groves, A. K. (2013). The role of Atonal transcription factors in the development of mechanosensitive cells. *Semin Cell Dev Biol*. **24**, 438-447.
- Jiang, L., Romero-Carvajal, A., Haug, J. S., Seidel, C. W. and Piotrowski, T. (2014). Gene-expression analysis of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **111**, E1383-1392.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. **337**, 816-821.
- Jurisch-Yaksi, N., Rose, A. J., Lu, H., Raemaekers, T., Munck, S., Baatsen, P., *et al.* (2013). Rer1p maintains ciliary length and signaling by regulating gamma-secretase activity and Foxj1a levels. *J Cell Biol.* **200**, 709-720.
- Kalouisi, A., Hoffbeck, A. S., Selemenakis, P. N., Pinder, J., Savage, K. I., Khanna, K. K., *et al.* (2015). The nuclear oncogene SET controls DNA repair by KAP1 and HP1 retention to chromatin. *Cell Rep.* **11**, 149-163.
- Kandilci, A. and Grosveld, G. C. (2005). SET-induced calcium signaling and MAPK/ERK pathway activation mediate dendritic cell-like differentiation of U937 cells. *Leukemia*. **19**, 1439-1445.
- Karetsou, Z., Emmanouilidou, A., Sanidas, I., Liokatis, S., Nikolakaki, E., Politou, A. S., *et al.* (2009). Identification of distinct SET/TAF-Ibeta domains required for core histone binding and quantitative characterisation of the interaction. *BMC Biochem.* **10**, 10.
- Karetsou, Z., Martic, G., Sflomos, G. and Papamarcaki, T. (2005). The histone chaperone SET/TAF-Ibeta interacts functionally with the CREB-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **335**, 322-327.
- Karetsou, Z., Martic, G., Tavoulari, S., Christoforidis, S., Wilm, M., Gruss, C., *et al.* (2004). Prothymosin alpha associates with the oncoprotein SET and is involved in chromatin decondensation. *FEBS Lett.* **577**, 496-500.
- Kato, K., Okuwaki, M. and Nagata, K. (2011). Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J Cell Sci.* **124**, 3254-3265.
- Kawase, H., Okuwaki, M., Miyaji, M., Ohba, R., Handa, H., Ishimi, Y., *et al.* (1996). NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *Genes Cells.* **1**, 1045-1056.
- Kay, J. N., Finger-Baier, K. C., Roeser, T., Staub, W. and Baier, H. (2001). Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a Zebrafish atonal Homolog. *Neuron*. **30**, 725-736.
- Kay, J. N., Link, B. A. and Baier, H. (2005). Staggered cell-intrinsic timing of ath5 expression underlies the wave of ganglion cell neurogenesis in the zebrafish retina. *Development.* **132**, 2573-2585.
- Keck, K. M. and Pemberton, L. F. (2012). Histone chaperones link histone nuclear import and chromatin assembly. *Biochim Biophys Acta.* **1819**, 277-289.
- Kellogg, D. R., Kikuchi, A., Fujii-Nakata, T., Turck, C. W. and Murray, A. W. (1995). Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins. *J Cell Biol.* **130**, 661-673.

- Kermen, F., Franco, L. M., Wyatt, C. and Yaksi, E. (2013). Neural circuits mediating olfactory-driven behavior in fish. *Front Neural Circuits*. **7**, 62.
- Kim, D. W., Kim, K. B., Kim, J. Y., Lee, K. S. and Seo, S. B. (2010). Negative regulation of neuronal cell differentiation by INHAT subunit SET/TAF-Ibeta. *Biochem Biophys Res Commun*. **400**, 419-425.
- Kim, E. G., Choi, M. E. and Ballermann, B. J. (1994). Spatially restricted expression of set mRNA in developing rat kidney. *Am J Physiol*. **266**, F155-161.
- Kim, J. Y., Lee, K. S., Seol, J. E., Yu, K., Chakravarti, D. and Seo, S. B. (2012). Inhibition of p53 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-Ibeta represses p53 activity. *Nucleic Acids Res*. **40**, 75-87.
- Kim, K. B., Kim, D. W., Park, J. W., Jeon, Y. J., Kim, D., Rhee, S., *et al.* (2014). Inhibition of Ku70 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-Ibeta regulates Ku70-mediated DNA damage response. *Cell Mol Life Sci*. **71**, 2731-2745.
- Kimmel, C. B. (1993). Patterning the brain of the zebrafish embryo. *Annu Rev Neurosci*. **16**, 707-732.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. **203**, 253-310.
- Kindt, K. S., Finch, G. and Nicolson, T. (2012). Kinocilia mediate mechanosensitivity in developing zebrafish hair cells. *Dev Cell*. **23**, 329-341.
- Krishnan, S., Smits, A. H., Vermeulen, M. and Reinberg, D. (2017). Phospho-H1 Decorates the Inter-chromatid Axis and Is Evicted along with Shugoshin by SET during Mitosis. *Mol Cell*. **67**, 579-593 e576.
- Kular, R. K., Cvetanovic, M., Siferd, S., Kini, A. R. and Opal, P. (2009). Neuronal differentiation is regulated by leucine-rich acidic nuclear protein (LANP), a member of the inhibitor of histone acetyltransferase complex. *J Biol Chem*. **284**, 7783-7792.
- Kumar, R. N., Radhakrishnan, R., Ha, J. H. and Dhanasekaran, N. (2004). Proteome analysis of NIH3T3 cells transformed by activated Galpha12: regulation of leukemia-associated protein SET. *J Proteome Res*. **3**, 1177-1183.
- Kutney, S. N., Hong, R., Macfarlan, T. and Chakravarti, D. (2004). A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-Ibeta in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression. *J Biol Chem*. **279**, 30850-30855.
- Lam, B. D., Anthony, E. C. and Hordijk, P. L. (2012). Analysis of nucleo-cytoplasmic shuttling of the proto-oncogene SET/I2PP2A. *Cytometry A*. **81**, 81-89.
- Lam, B. D., Anthony, E. C. and Hordijk, P. L. (2013a). Cytoplasmic targeting of the proto-oncogene SET promotes cell spreading and migration. *FEBS Lett*. **587**, 111-119.

- Lam, B. D., Anthony, E. C. and Hordijk, P. L. (2013b). The Immunosuppressant FTY720 (Fingolimod) Induces Nuclear Exit of the Proto-oncogene SET/I2PP2A. *Mol Cell Pharmacol.* **5**, 95-107.
- Lam, B. D. and Hordijk, P. L. (2013). The Rac1 hypervariable region in targeting and signaling: a tail of many stories. *Small GTPases.* **4**, 78-89.
- Lawson, N. D. and Wolfe, S. A. (2011). Forward and reverse genetic approaches for the analysis of vertebrate development in the zebrafish. *Dev Cell.* **21**, 48-64.
- Le Goff, M. M. and Bishop, P. N. (2007). Focus on molecules: opticin. *Exp Eye Res.* **85**, 303-304.
- Leopoldino, A. M., Squarize, C. H., Garcia, C. B., Almeida, L. O., Pestana, C. R., Polizello, A. C., *et al.* (2012). Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: cell survival or death signaling. *Mol Cell Biochem.* **363**, 65-74.
- Li, M., Guo, H. and Damuni, Z. (1995). Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry.* **34**, 1988-1996.
- Li, M., Makkinje, A. and Damuni, Z. (1996a). Molecular identification of I1PP2A, a novel potent heat-stable inhibitor protein of protein phosphatase 2A. *Biochemistry.* **35**, 6998-7002.
- Li, M., Makkinje, A. and Damuni, Z. (1996b). The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* **271**, 11059-11062.
- Lieberman, J. and Fan, Z. (2003). Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol.* **15**, 553-559.
- Lindeman, R. E. and Pelegri, F. (2010). Vertebrate maternal-effect genes: Insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish. *Mol Reprod Dev.* **77**, 299-313.
- Lister, J. A. (2002). Development of pigment cells in the zebrafish embryo. *Microsc Res Tech.* **58**, 435-441.
- Liu, C. and Gotz, J. (2013). How it all started: tau and protein phosphatase 2A. *J Alzheimers Dis.* **37**, 483-494.
- Liu, H., Gu, Y., Wang, H., Yin, J., Zheng, G., Zhang, Z., *et al.* (2015). Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* **6**, 14913-14925.
- Liu, Z., Jang, S. W., Liu, X., Cheng, D., Peng, J., Yepes, M., *et al.* (2008). Neuroprotective actions of PIKE-L by inhibition of SET proteolytic degradation by asparagine endopeptidase. *Mol Cell.* **29**, 665-678.



- Loosli, F., Winkler, S., Burgtorf, C., Wurmbach, E., Ansorge, W., Henrich, T., *et al.* (2001). Medaka eyeless is the key factor linking retinal determination and eye growth. *Development*. **128**, 4035-4044.
- Loven, M. A., Muster, N., Yates, J. R. and Nardulli, A. M. (2003). A novel estrogen receptor alpha-associated protein, template-activating factor Ibeta, inhibits acetylation and transactivation. *Mol Endocrinol*. **17**, 67-78.
- Lust, K., Sinn, R., Saturnino, A. P., Centanin, L. and Wittbrodt, J. (2016). De novo neurogenesis by targeted expression of Atoh7 to Muller glia cells. *Development*.
- Macfarlan, T., Parker, J. B., Nagata, K. and Chakravarti, D. (2006). Thanatos-associated protein 7 associates with template activating factor-Ibeta and inhibits histone acetylation to repress transcription. *Mol Endocrinol*. **20**, 335-347.
- Madeira, A., Pommet, J. M., Prochiantz, A. and Allinquant, B. (2005). SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. *FASEB J*. **19**, 1905-1907.
- Martinvalet, D., Zhu, P. and Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. **22**, 355-370.
- Matsuda, M. and Chitnis, A. B. (2010). Atoh1a expression must be restricted by Notch signaling for effective morphogenesis of the posterior lateral line primordium in zebrafish. *Development*. **137**, 3477-3487.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Kikuchi, A. and Tsujimoto, M. (1999a). Sperm chromatin decondensation by template activating factor I through direct interaction with basic proteins. *Mol Cell Biol*. **19**, 6940-6952.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Okuwaki, M. and Tsujimoto, M. (1999b). Histone- and chromatin-binding activity of template activating factor-I. *FEBS Lett*. **463**, 285-288.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Ui, M. and Hanaoka, F. (1993). Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J Biol Chem*. **268**, 10582-10587.
- Matsuoka, Y., Nagahara, Y., Ikekita, M. and Shinomiya, T. (2003). A novel immunosuppressive agent FTY720 induced Akt dephosphorylation in leukemia cells. *Br J Pharmacol*. **138**, 1303-1312.
- Mellor, J. (2005). The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Mol Cell*. **19**, 147-157.
- Millimaki, B. B., Sweet, E. M., Dhason, M. S. and Riley, B. B. (2007). Zebrafish atoh1 genes: classic proneural activity in the inner ear and regulation by Fgf and Notch. *Development*. **134**, 295-305.

- Miyaji-Yamaguchi, M., Okuwaki, M. and Nagata, K. (1999). Coiled-coil structure-mediated dimerization of template activating factor-I is critical for its chromatin remodeling activity. *J Mol Biol.* **290**, 547-557.
- Miyamoto, S., Suzuki, T., Muto, S., Aizawa, K., Kimura, A., Mizuno, Y., *et al.* (2003). Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA-binding domain. *Mol Cell Biol.* **23**, 8528-8541.
- Morita, A., Suzuki, N., Matsumoto, Y., Hirano, K., Enomoto, A., Zhu, J., *et al.* (2000). p41 as a possible marker for cell death is generated by caspase cleavage of p42/SETbeta in irradiated MOLT-4 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **278**, 627-632.
- Mukhopadhyay, A., Saddoughi, S. A., Song, P., Sultan, I., Ponnusamy, S., Senkal, C. E., *et al.* (2009). Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling. *FASEB J.* **23**, 751-763.
- Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., *et al.* (2007). Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 4285-4290.
- Nagata, K., Kawase, H., Handa, H., Yano, K., Yamasaki, M., Ishimi, Y., *et al.* (1995). Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 4279-4283.
- Nagata, K., Saito, S., Okuwaki, M., Kawase, H., Furuya, A., Kusano, A., *et al.* (1998). Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Exp Cell Res.* **240**, 274-281.
- Neuhauss, S. C. F. (2010) 3 - Zebrafish vision: Structure and function of the zebrafish visual system. In: S. F. Perry, M. Ekker, A. P. Farrell and C. J. Brauner, editors. *Fish Physiology*: Academic Press. pp. 81-122.
- Neviani, P., Harb, J. G., Oaks, J. J., Santhanam, R., Walker, C. J., Ellis, J. J., *et al.* (2013). PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J Clin Invest.* **123**, 4144-4157.
- Nicolson, T. (2005). The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu Rev Genet.* **39**, 9-22.
- Nishi, H., Hashimoto, K. and Panchenko, A. R. (2011). Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure.* **19**, 1807-1815.
- Niwa, N., Hiromi, Y. and Okabe, M. (2004). A conserved developmental program for sensory organ formation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* **36**, 293-297.

- Nogare, D. D., Nikaido, M., Somers, K., Head, J., Piotrowski, T. and Chitnis, A. B. (2017). In toto imaging of the migrating Zebrafish lateral line primordium at single cell resolution. *Dev Biol.* **422**, 14-23.
- Oaks, J. J., Santhanam, R., Walker, C. J., Roof, S., Harb, J. G., Ferencik, G., *et al.* (2013). Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood.* **122**, 1923-1934.
- Ogawa, Y., Shiraki, T., Kojima, D. and Fukada, Y. (2015). Homeobox transcription factor Six7 governs expression of green opsin genes in zebrafish. *Proc Biol Sci.* **282**, 20150659.
- Okuwaki, M. and Nagata, K. (1998). Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template. *J Biol Chem.* **273**, 34511-34518.
- Ouellet, V., Le Page, C., Guyot, M. C., Lussier, C., Tonin, P. N., Provencher, D. M., *et al.* (2006). SET complex in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* **119**, 2119-2126.
- Papavassiliou, A. G., Treier, M., Chavrier, C. and Bohmann, D. (1992). Targeted degradation of c-Fos, but not v-Fos, by a phosphorylation-dependent signal on c-Jun. *Science.* **258**, 1941-1944.
- Park, S. H., Yeo, S. Y., Yoo, K. W., Hong, S. K., Lee, S., Rhee, M., *et al.* (2003). Zath3, a neural basic helix-loop-helix gene, regulates early neurogenesis in the zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun.* **308**, 184-190.
- Park, Y. J. and Luger, K. (2006a). Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem Cell Biol.* **84**, 549-558.
- Park, Y. J. and Luger, K. (2006b). The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 1248-1253.
- Patmanathan, S. N., Yap, L. F., Murray, P. G. and Paterson, I. C. (2015). The antineoplastic properties of FTY720: evidence for the repurposing of fingolimod. *J Cell Mol Med.* **19**, 2329-2340.
- Perrotti, D. and Neviani, P. (2013). Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *Lancet Oncol.* **14**, e229-238.
- Piloto, S. and Schilling, T. F. (2010). Ovo1 links Wnt signaling with N-cadherin localization during neural crest migration. *Development.* **137**, 1981-1990.
- Pinto, G., Radulovic, M. and Godovac-Zimmermann, J. (2018). Spatial perspectives in the redox code-Mass spectrometric proteomics studies of moonlighting proteins. *Mass Spectrom Rev.* **37**, 81-100.
- Piper, M., Dwivedy, A., Leung, L., Bradley, R. S. and Holt, C. E. (2008). NF-protocadherin and TAF1 regulate retinal axon initiation and elongation in vivo. *J Neurosci.* **28**, 100-105.

- Pippa, R., Dominguez, A., Christensen, D. J., Moreno-Miralles, I., Blanco-Prieto, M. J., Vitek, M. P., *et al.* (2014). Effect of FTY720 on the SET-PP2A complex in acute myeloid leukemia; SET binding drugs have antagonistic activity. *Leukemia*. **28**, 1915-1918.
- Prasov, L. and Glaser, T. (2012). Pushing the envelope of retinal ganglion cell genesis: context dependent function of Math5 (Atoh7). *Dev Biol*. **368**, 214-230.
- Qi, S. T., Wang, Z. B., Ouyang, Y. C., Zhang, Q. H., Hu, M. W., Huang, X., *et al.* (2013). Overexpression of SETbeta, a protein localizing to centromeres, causes precocious separation of chromatids during the first meiosis of mouse oocytes. *J Cell Sci*. **126**, 1595-1603.
- Qiu, Y., Guo, M., Huang, S. and Stein, R. (2004). Acetylation of the BETA2 transcription factor by p300-associated factor is important in insulin gene expression. *J Biol Chem*. **279**, 9796-9802.
- Qu, D., Li, Q., Lim, H. Y., Cheung, N. S., Li, R., Wang, J. H., *et al.* (2002). The protein SET binds the neuronal Cdk5 activator p35nck5a and modulates Cdk5/p35nck5a activity. *J Biol Chem*. **277**, 7324-7332.
- Qu, D., Zhang, Y., Ma, J., Guo, K., Li, R., Yin, Y., *et al.* (2007). The nuclear localization of SET mediated by impalpha3/impbeta attenuates its cytosolic toxicity in neurons. *J Neurochem*. **103**, 408-422.
- Rashid, D., Newell, K., Shama, L. and Bradley, R. (2006). A requirement for NF-protocadherin and TAF1/Set in cell adhesion and neural tube formation. *Dev Biol*. **291**, 170-181.
- Rauch, G. J., Lyons, D. A., Middendorf, I., Friedlander, B., Arana, N., Reyes, T., *et al.* (2003). Submission and Curation of Gene Expression Data. *ZFIN Direct Data Submission* (<http://zfin.org>).
- Ravi, V. and Venkatesh, B. (2008). Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. *Curr Opin Genet Dev*. **18**, 544-550.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., *et al.* (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. **302**, 1704-1709.
- Robu, M. E., Larson, J. D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S. A., *et al.* (2007). p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet*. **3**, e78.
- Saavedra, F., Rivera, C., Rivas, E., Merino, P., Garrido, D., Hernandez, S., *et al.* (2017). PP32 and SET/TAF-Ibeta proteins regulate the acetylation of newly synthesized histone H4. *Nucleic Acids Res*. **45**, 11700-11710.
- Saddoughi, S. A., Gencer, S., Peterson, Y. K., Ward, K. E., Mukhopadhyay, A., Oaks, J., *et al.* (2013). Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med*. **5**, 105-121.

- Saito, S., Cigdem, S., Okuwaki, M. and Nagata, K. (2016). Leukemia-Associated Nup214 Fusion Proteins Disturb the XPO1-Mediated Nuclear-Cytoplasmic Transport Pathway and Thereby the NF-kappaB Signaling Pathway. *Mol Cell Biol.* **36**, 1820-1835.
- Saito, S., Miyaji-Yamaguchi, M., Shimoyama, T. and Nagata, K. (1999). Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* **259**, 471-475.
- Sanchez, M., Ceci, M. L., Gutierrez, D., Anguita-Salinas, C. and Allende, M. L. (2016). Mechanosensory organ regeneration in zebrafish depends on a population of multipotent progenitor cells kept latent by Schwann cells. *BMC Biol.* **14**, 27.
- Sander, J. D. and Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* **32**, 347-355.
- Sandrock, K., Bielek, H., Schradi, K., Schmidt, G. and Klugbauer, N. (2010). The nuclear import of the small GTPase Rac1 is mediated by the direct interaction with karyopherin alpha2. *Traffic.* **11**, 198-209.
- Sangodkar, J., Farrington, C. C., McClinch, K., Galsky, M. D., Kastrinsky, D. B. and Narla, G. (2016). All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *FEBS J.* **283**, 1004-1024.
- Sarrazin, A. F., Villablanca, E. J., Nunez, V. A., Sandoval, P. C., Ghysen, A. and Allende, M. L. (2006). Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line. *Dev Biol.* **295**, 534-545.
- Sato, A. and Takeda, H. (2013). Neuronal subtypes are specified by the level of neurod expression in the zebrafish lateral line. *J Neurosci.* **33**, 556-562.
- Schmidt, R., Strähle, U. and Scholpp, S. (2013). Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural Dev.* **8**, 3.
- Schneider, R., Bannister, A. J., Weise, C. and Kouzarides, T. (2004). Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *J Biol Chem.* **279**, 23859-23862.
- Seiler, C. and Nicolson, T. (1999). Defective calmodulin-dependent rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants. *J Neurobiol.* **41**, 424-434.
- Seo, S. B., Macfarlan, T., McNamara, P., Hong, R., Mukai, Y., Heo, S., *et al.* (2002). Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex. *J Biol Chem.* **277**, 14005-14010.
- Seo, S. B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W. S. and Chakravarti, D. (2001). Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell.* **104**, 119-130.
- Sharma, A., Moore, M., Marcora, E., Lee, J. E., Qiu, Y., Samaras, S., *et al.* (1999). The NeuroD1/BETA2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those

necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding. *Mol Cell Biol.* **19**, 704-713.

Shen, Y. C. and Raymond, P. A. (2004). Zebrafish cone-rod (crx) homeobox gene promotes retinogenesis. *Dev Biol.* **269**, 237-251.

Shikama, N., Chan, H. M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Lee, C. W., Cairns, W., *et al.* (2000). Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators. *Mol Cell Biol.* **20**, 8933-8943.

Shin, K. S., Shin, E. Y., Bae, S. C., Kim, S. R., Jeong, G. B., Kwak, S. J., *et al.* (1999). Expression of SET is modulated as a function of cell proliferation. *J Cell Biochem.* **74**, 119-126.

Solomon, K. S., Kudoh, T., Dawid, I. B. and Fritz, A. (2003). Zebrafish foxi1 mediates otic placode formation and jaw development. *Development.* **130**, 929-940.

Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed, Z. F. and Smith, C. (2007). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology.* **71**, 304-309.

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

Stainier, D. Y. R., Raz, E., Lawson, N. D., Ekker, S. C., Burdine, R. D., Eisen, J. S., *et al.* (2017). Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet.* **13**, e1007000.

Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* **85**, 845-881.

Stubbs, J. L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J. C. and Kintner, C. (2008). The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat Genet.* **40**, 1454-1460.

Summerton, J. and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7**, 187-195.

Summerton, J. E. (2007). Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Curr Top Med Chem.* **7**, 651-660.

Sundaresan, P. and Farndale, R. W. (2002). P38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. *FEBS Lett.* **528**, 139-144.

Suzuki, T., Muto, S., Miyamoto, S., Aizawa, K., Horikoshi, M. and Nagai, R. (2003). Functional interaction of the DNA-binding transcription factor Sp1 through its DNA-binding domain with the histone chaperone TAF-I. *J Biol Chem.* **278**, 28758-28764.

- Switzer, C. H., Cheng, R. Y. S., Vitek, T. M., Christensen, D. J., Wink, D. A. and Vitek, M. P. (2011). Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene*. **30**, 2504-2513.
- Tanimukai, H., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2005). Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. **166**, 1761-1771.
- ten Klooster, J. P., Leeuwen, I., Scheres, N., Anthony, E. C. and Hordijk, P. L. (2007). Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *Embo J*. **26**, 336-345.
- Thisse, C. and Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc*. **3**, 59-69.
- Trakhtenberg, E. F., Morkin, M. I., Patel, K. H., Fernandez, S. G., Sang, A., Shaw, P., *et al.* (2015). The N-terminal Set-beta Protein Isoform Induces Neuronal Death. *J Biol Chem*. **290**, 13417-13426.
- Trakhtenberg, E. F., Wang, Y., Morkin, M. I., Fernandez, S. G., Mlacker, G. M., Shechter, J. M., *et al.* (2014). Regulating Set-beta's Subcellular Localization Toggles Its Function between Inhibiting and Promoting Axon Growth and Regeneration. *J Neurosci*. **34**, 7361-7374.
- Trotta, R., Ciarlariello, D., Dal Col, J., Allard, J., 2nd, Neviani, P., Santhanam, R., *et al.* (2007). The PP2A inhibitor SET regulates natural killer cell IFN-gamma production. *J Exp Med*. **204**, 2397-2405.
- Vaesen, M., Barnikol-Watanabe, S., Gotz, H., Awni, L. A., Cole, T., Zimmermann, B., *et al.* (1994). Purification and characterization of two putative HLA class II associated proteins: PHAPI and PHAPII. *Biol Chem Hoppe Seyler*. **375**, 113-126.
- van den Hurk, R. and Lambert, J. G. D. (1983). Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Canadian Journal of Zoology*. **61**, 2381-2387.
- van den Hurk, R. and Resink, J. W. (1992). Male reproductive system as sex pheromone producer in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*. **261**, 204-213.
- Van Vlierberghe, P., van Grotel, M., Tchinda, J., Lee, C., Beverloo, H. B., van der Spek, P. J., *et al.* (2008). The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **111**, 4668-4680.
- Vasudevan, N. T., Mohan, M. L., Gupta, M. K., Hussain, A. K. and Naga Prasad, S. V. (2011). Inhibition of protein phosphatase 2A activity by PI3Kgamma regulates beta-adrenergic receptor function. *Mol Cell*. **41**, 636-648.
- Vera, J., Estanyol, J. M., Canela, N., Llorens, F., Agell, N., Itarte, E., *et al.* (2007). Proteomic analysis of SET-binding proteins. *Proteomics*. **7**, 578-587.

- Vera, J., Jaumot, M., Estanyol, J. M., Brun, S., Agell, N. and Bachs, O. (2006). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 is a SET-binding protein and a PP2A inhibitor. *Oncogene*. **25**, 260-270.
- Vojtek, A. B., Taylor, J., DeRuiter, S. L., Yu, J. Y., Figueroa, C., Kwok, R. P., *et al.* (2003). Akt regulates basic helix-loop-helix transcription factor-coactivator complex formation and activity during neuronal differentiation. *Mol Cell Biol*. **23**, 4417-4427.
- von Hofsten, J. and Olsson, P. E. (2005). Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod Biol Endocrinol*. **3**, 63.
- von Lindern, M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeyer, A. and Grosveld, G. (1992). Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol*. **12**, 3346-3355.
- Wan, Y., Almeida, A. D., Rulands, S., Chalour, N., Muresan, L., Wu, Y., *et al.* (2016). The ciliary marginal zone of the zebrafish retina: clonal and time-lapse analysis of a continuously growing tissue. *Development*. **143**, 1099-1107.
- Wang, D., Kon, N., Lasso, G., Jiang, L., Leng, W., Zhu, W. G., *et al.* (2016). Acetylation-regulated interaction between p53 and SET reveals a widespread regulatory mode. *Nature*. **538**, 118-122.
- Westra, E. R., Buckling, A. and Fineran, P. C. (2014). CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbiol*. **12**, 317-326.
- Whitfield, T. T. (2002). Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J Neurobiol*. **53**, 157-171.
- Whitfield, T. T. (2015). Development of the inner ear. *Curr Opin Genet Dev*. **32**, 112-118.
- Whitfield, T. T., Riley, B. B., Chiang, M. Y. and Phillips, B. (2002). Development of the zebrafish inner ear. *Dev Dyn*. **223**, 427-458.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H. and Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. **482**, 331-338.
- Williams, J. A. and Holder, N. (2000). Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear Res*. **143**, 171-181.
- Wloga, D., Webster, D. M., Rogowski, K., Bre, M. H., Levilliers, N., Jerka-Dziadosz, M., *et al.* (2009). TTLL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev Cell*. **16**, 867-876.
- Wu, X. and Brewer, G. (2012). The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene*. **500**, 10-21.



Yu, G., Yan, T., Feng, Y., Liu, X., Xia, Y., Luo, H., *et al.* (2013). Ser9 phosphorylation causes cytoplasmic detention of I2PP2A/SET in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. **34**, 1748-1758.

Yu, X., Ng, C. P., Habacher, H. and Roy, S. (2008). Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat Genet*. **40**, 1445-1453.

Yuan, X., Wang, X., Gu, B., Ma, Y., Liu, Y., Sun, M., *et al.* (2017). Directional Migration in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) is Epigenetically Regulated by SET Nuclear Oncogene, a Member of the Inhibitor of Histone Acetyltransferase Complex. *Neoplasia*. **19**, 868-884.

Zhan, Q., Ge, Q., Ohira, T., Van Dyke, T. and Badwey, J. A. (2003). p21-activated kinase 2 in neutrophils can be regulated by phosphorylation at multiple sites and by a variety of protein phosphatases. *J Immunol*. **171**, 3785-3793.

Zhao, X., Yang, H., Yamoah, E. N. and Lundberg, Y. W. (2007). Gene targeting reveals the role of Oc90 as the essential organizer of the otoconial organic matrix. *Dev Biol*. **304**, 508-524.

Zou, P., Wu, S. Y., Koteiche, H. A., Mishra, S., Levic, D. S., Knapik, E., *et al.* (2015). A conserved role of alphaA-crystallin in the development of the zebrafish embryonic lens. *Exp Eye Res*. **138**, 104-113.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προέκυψε μία δημοσίευση σε επιστημονικό περιοδικό με κριτές.

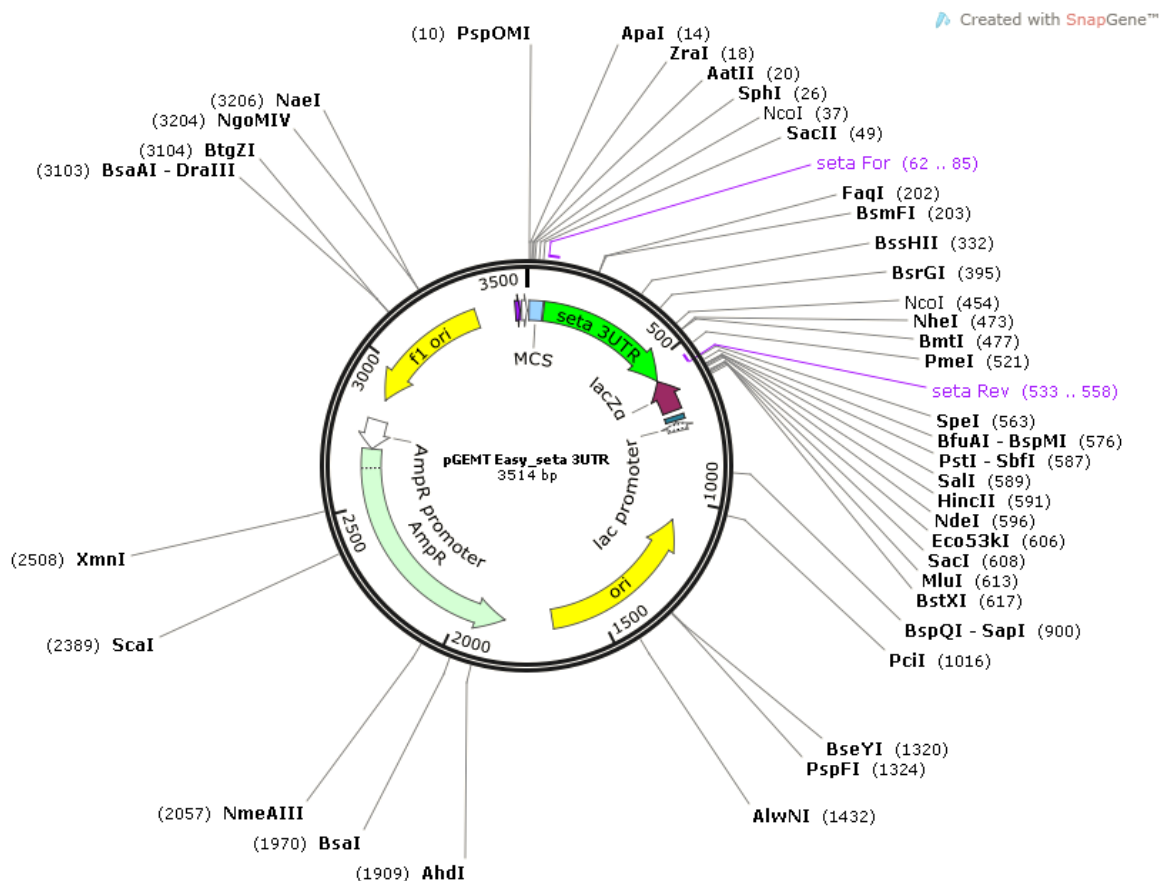
**Serifi, I.**, Tzima, E., Soupsana, K., Karetsou, Z., Beis, D. and Papamarcaki, T. (2016). The zebrafish homologs of SET/I2PP2A oncoprotein: expression patterns and insights into their physiological roles during development. *Biochem J.* **473** 4609–4627.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

## Παράρτημα 1

### Πλασμιδιακοί χάρτες

# Χάρτες των πλασμιδιακών φορέων pGEMTEasy\_setα3UTR και pGEMTEasy\_setβ3UTR. Οι πλασμιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των ιχνηθετών έναντι των μεταγράφων *seta* και *setb* στα πλαίσια του *in situ* υβριδισμού.



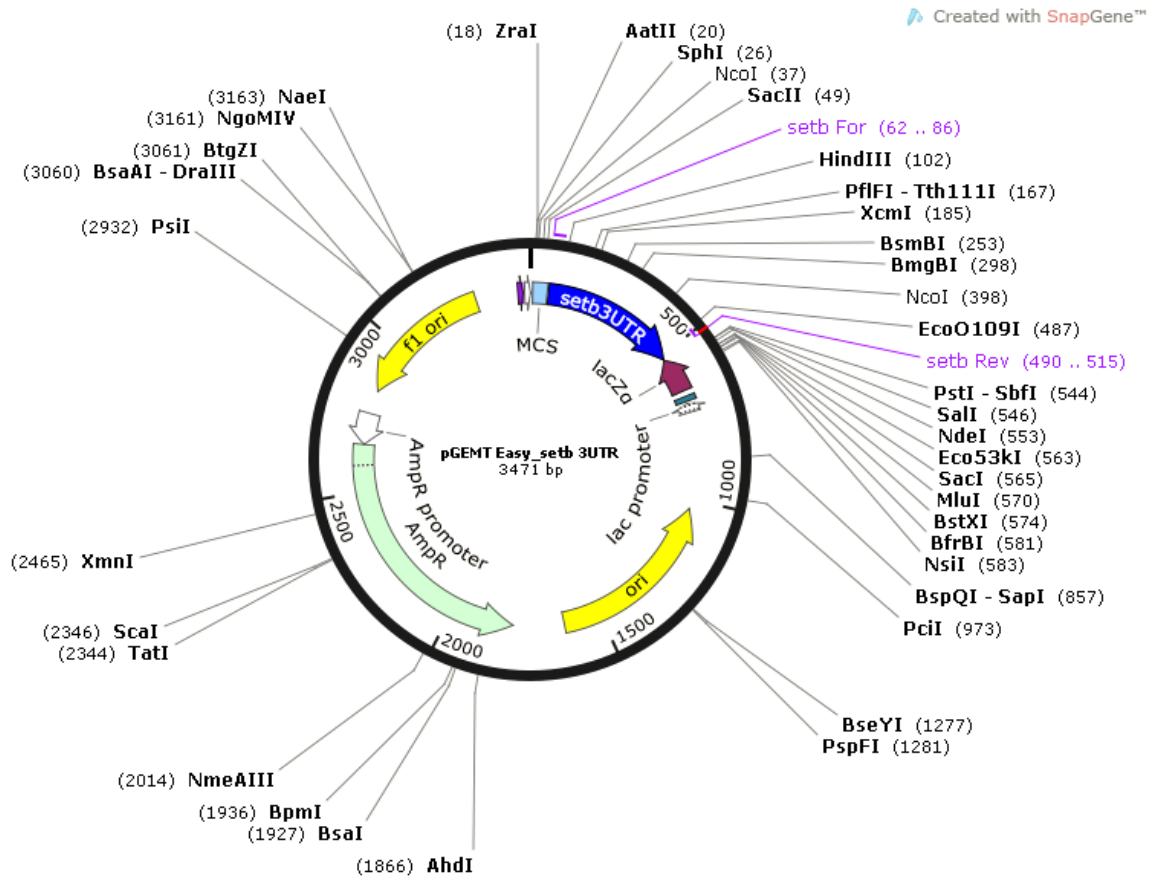
### setα 3' UTR

probe ISH

5' → 3'

485 b

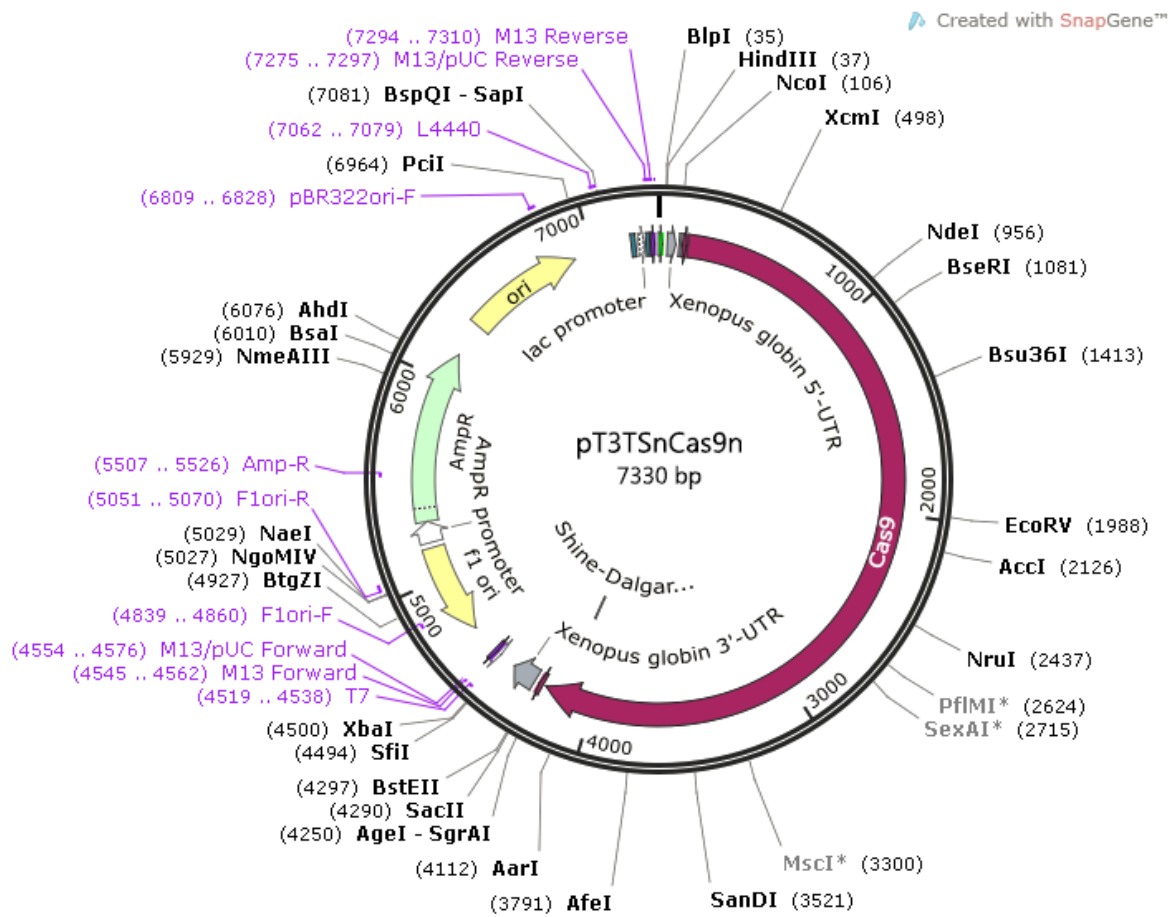
```
TCCCCAGTCCTGTTTCCAAATTGCTTCTTTGGCTTTTTTTGTTATTTTTTTC
GTGGAGCAAGAATGATGCTTTTTTCCCTCCTTCTTCTCAGATTGTTTTGT
TTTTTGCTCCATCTTTCCCTGTCTTGAACCTTGCCATGTTGAAGTCCCCGAA
CAGACTCACAATAAACTGACTGCAAAATCTTGCCAACATGGCATCTACCATCT
CAATTTCCAAATGCATTTTCGAGGTAAAAAGCAAAACACTGTAGTTATCGGCTG
CGCGCCGTCTGGAGTAGACTTACAAATAGTGCTTTCGTTTTGTTTTTTATAA
ATATATATATGTACAAATATGTATAATTTCTTCCCTGTAAAGTTTTGTGTAG
GTAATTGAACAGAAGCCATGGTGCGCAGTGATCTGCTAGCTCTAGCGTCTCC
ACAGTTTGCTTTTCTTTATTTTGGGTGTTTAAACCCGTCATGGTTTAAATCAGC
TGATAGAC
```

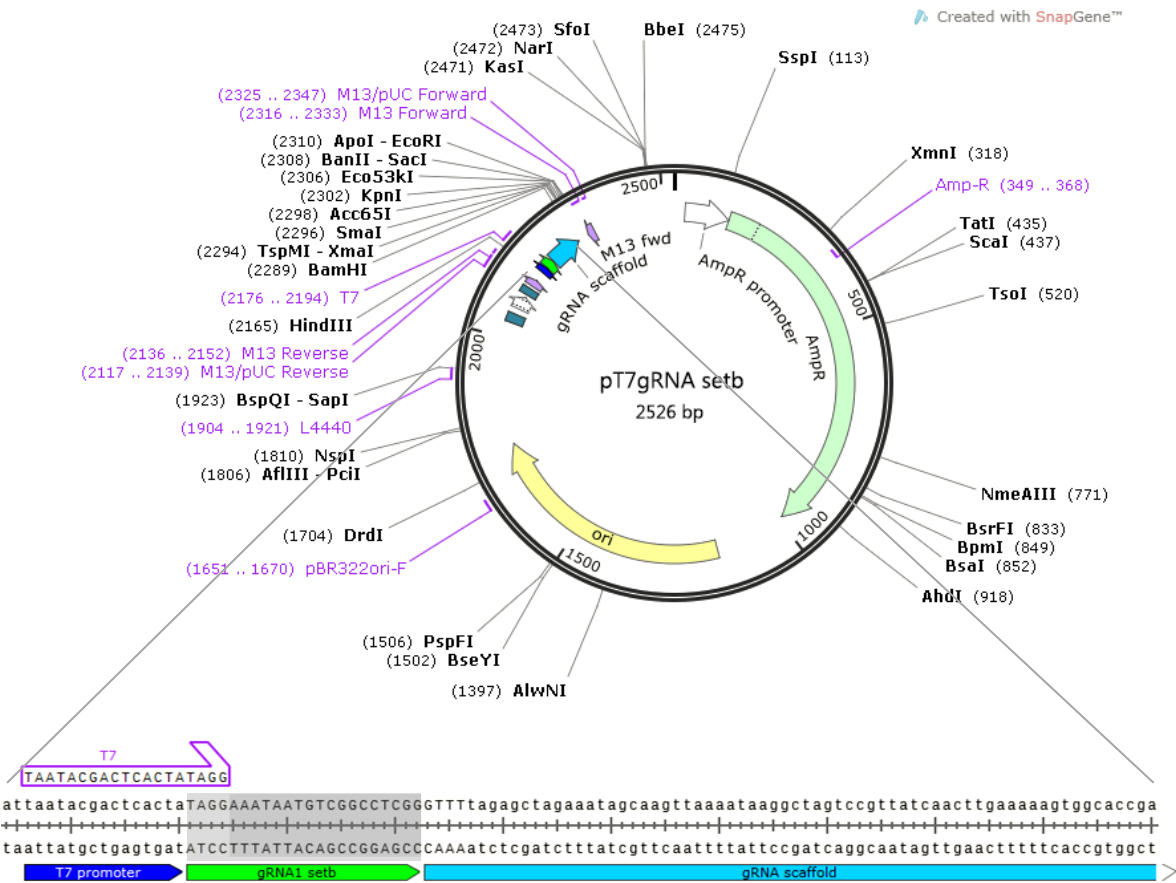


**setb 3' UTR**  
 probe ISH  
 5'→3'  
 442 b

GAAGTCATCCTCCAACCACGGGAGCAAAAAAAAAAAGCTTTCTTTTTTATTT  
 TAATTTTGGTTGGGCTCCATCTTCTGTTCTACTGAAGCCTGTCTGACCATGT  
 CAAAACCCAGTAATTCCTGGACATTCAGTACCTGCATTGGAAACTAGTGG  
 CATCTCGTTGCTGAAGCCTCTTGCGTCTCATCTTTAATTACAACCATCTCCA  
 AAGACAAAATTAACAATCTGCACGTCACCTCTGTAGACTAAACTGAAGTAAA  
 TAGCAGTTTATATATTAAGTATATAAAGATTTTCTTTCTCTGTGAATGGTTG  
 TGAGTTGAAGTAATAAGCCATGGTGCAGTGATCTAATCATAGCGTACATACC  
 TTCCCAGTGTCTTTCTTTCTTTTGTGTTTGTATATTTCTTTAATGCAGAGG  
 TGGGCCCAAGAGTTGACACTGTT

# Χάρτες των πλασμιδιακών φορέων pT3TSnCas9n και pT7gRNAsetb που χρησιμοποιήθηκαν για τη στόχευση του γονιδίου *setb* σε έμβρυα zebrafish, με την εφαρμογή του συστήματος CRISPR-Cas9.





# Η γενωμική περιοχή του γονιδίου *setb* εντός της οποίας βρίσκεται η περιοχή στόχευσης gRNA. Το συγκεκριμένο τμήμα gDNA ενισχύθηκε μέσω PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και αναλύθηκε μέσω αλληλούχισης Sanger. Με μπλε πλαίσιο υποδεικνύεται η περιοχή στόχευσης gRNA παρακείμενα της οποίας εντοπίζεται η περιοχή PAM.



## Παράρτημα 2

### ✂ Χαρακτηρισμός αντισωμάτων

Η μελέτη των προτύπων κατανομής των πρωτεϊνών Seta/b μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού όσο και των αντίστοιχων επιπέδων έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, έγινε με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.

Λόγω του υψηλού ποσοστού ταυτότητας των πρωτεϊνών Seta και Setb σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, δεν ήταν εφικτός ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο με τη χρήση του αντισώματος anti-I2PP2A (Santa Cruz). Πρόκειται για ένα πολυκλωνικό αντίσωμα εμπορικής προέλευσης το οποίο αναγνωρίζει επίτοπο στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης SET (αα 1-120). Δεδομένης της ομοιότητας μεταξύ των πρωτεϊνών SET, Seta και Setb (Εικόνα 4.1), το εν λόγω αντίσωμα αναγνωρίζει και τις πρωτεΐνες του zebrafish. Το anti-I2PP2A χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης Western, ωστόσο δεν ήταν κατάλληλο για πειράματα ανοσοφθορισμού.

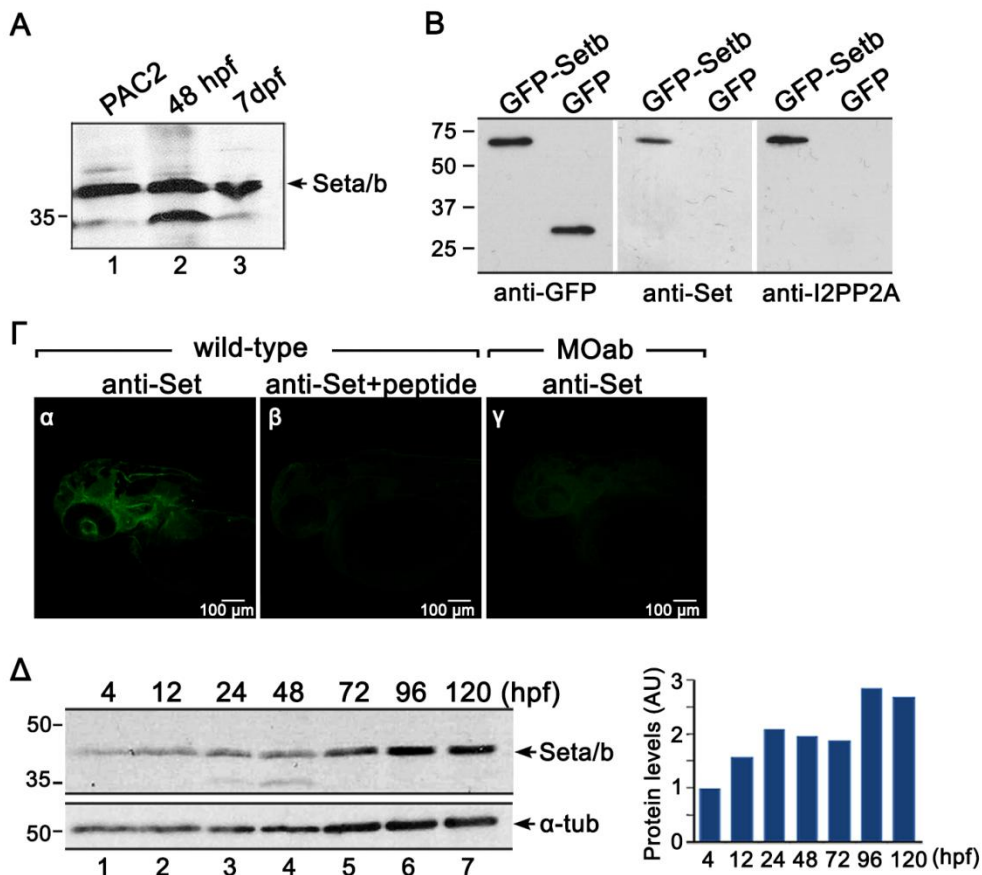
Εξαιτίας αυτού συντέθηκε ένα νέο πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο σχεδιάστηκε έναντι των πρώτων 23 αμινοξέων (αα 1-23) της Setb και απομονώθηκε μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Το νέο αντίσωμα, anti-Set, ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση και τη συγγένεια για τις πρωτεΐνες Seta/b του zebrafish μέσω ανοσοαποτύπωσης Western χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα από ινοβλαστικά κύτταρα zebrafish PAC2, από έμβρυα 48 hpf και από προνύμφες 7 dpf zebrafish (Εικόνα 1A). Όπως φαίνεται στην εικόνα και στα τρία εκχυλίσματα, το αντίσωμα αναγνωρίζει μία κύρια ζώνη ~39 kDa η οποία αντιστοιχεί στο προβλεπόμενο μοριακό βάρος των Seta/b. Επιπλέον αυτής, στην περίπτωση του εκχυλίσματος από έμβρυα 48 hpf, αναγνωρίζει και μία μικρότερη ~35 kDa, την οποία ανιχνεύει και το αντίσωμα anti-I2PP2A σε αντίστοιχο εκχύλισμα εμβρύων 48 hpf (Εικόνα 4.9B). Η ζώνη μικρότερου μεγέθους πιθανά οφείλεται σε πρωτεολυτική διάσπαση των Seta/b. Η συγκεκριμένη παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με δημοσιευμένη μελέτη στην οποία βρέθηκε ότι η SET υφίσταται πρωτεόλυση από την κασπάση 7 στο αμινοτελικό της άκρο, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Morita *et al.*, 2000). Επιπλέον αυτής, αντίστοιχες περιπτώσεις πρωτεόλυσης έχουν περιγραφεί σε κύτταρα K562 (Beresford *et al.*, 2001), HeLa (Chowdhury *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2003a), HEK293 (Liu Z. *et al.*, 2008) και σε γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή (Trakhtenberg *et al.*, 2015).

Τα δύο αντισώματα ελέγχθηκαν και ως προς την αναγνώριση της πρωτεΐνης Setb μετά από εκτοπική έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP-Setb σε κύτταρα HEK293. Στην Εικόνα 1B, φαίνεται η εξειδίκευση των αντισωμάτων καθώς αναγνωρίζουν μόνο τη ζώνη που αντιστοιχεί στη χιμαιρική πρωτεΐνη.

Η εξειδίκευση του anti-Set αντισώματος προς τις Seta/b επιβεβαιώθηκε και μετά από πειράματα ανοσοφθορισμού, όπου παρουσία του πεπτιδίου-αντιγόνου διαπιστώνεται

σημαντική μείωση της έντασης του φθορισμού (Εικόνα 1Γ-β), αντίστοιχη εκείνης που έχει προκληθεί από παρεμπόδιση έκφρασης των *Seta/b* μετά από μικροέγχυση ATG-MO (MOab) (Εικόνα 1Γ-γ).

Τέλος, η έκφραση των πρωτεϊνών *Seta/b* ανιχνεύθηκε σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που ελέγχθηκαν, ακόμη και πολύ πρώιμα στις ~ 3.5-4 hpf όπου τα επίπεδα των πρωτεϊνών είναι σχετικά χαμηλά και πιθανά είναι μητρικής προέλευσης (Εικόνα 1Δ).



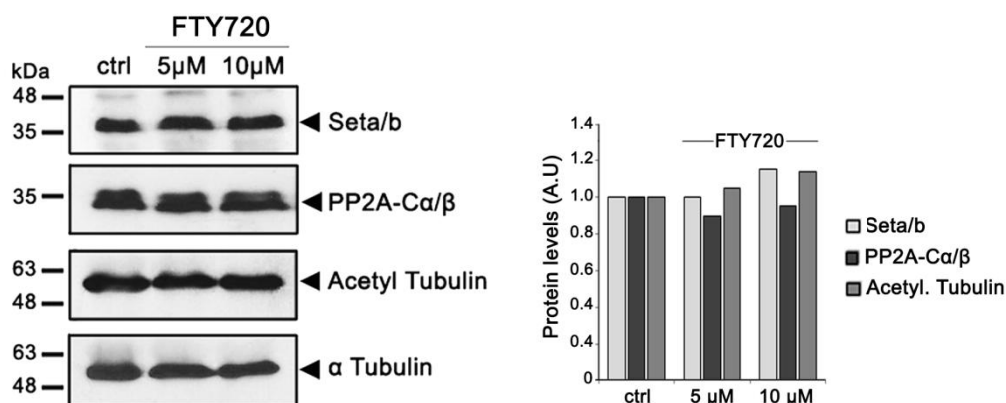
**Εικόνα 1. Ανίχνευση των πρωτεϊνών *Seta/b* με τη χρήση των αντισωμάτων anti-Set και anti-I2PP2A.** (A) Χαρακτηρισμός του αντισώματος anti-Set. Εκχυλίσματα τα οποία προήλθαν από ινοβλαστικά κύτταρα zebrafish PAC2, έμβρυα (48 hpf) και προνύμφες (7 dpf) zebrafish, διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά με SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με το anti-Set αντίσωμα και η εμφάνιση των ζωνών έγινε με τη χρήση ECL. (B) Κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια GFP και GFP-Setb. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση Western χρησιμοποιώντας τα αντισώματα anti-GFP, anti-Set και anti-I2PP2A. (Γ) Ανοσοφθορισμός εμβρύων zebrafish 48 hpf με το αντίσωμα anti-Set, απουσία (α) και παρουσία (β) του αντιγονικού πεπτιδίου. Η μείωση της έντασης του φθορισμού λόγω σύνδεσης του πεπτιδίου στο αντίσωμα, είναι εμφανής και συγκρίσιμη με τη αντίστοιχη λόγω μείωσης έκφρασης των *seta/b* σε έμβρυα morphants 48 hpf (γ). (Δ) Έκφραση των πρωτεϊνών *Seta/b* και τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του zebrafish (4-120 hpf). Συλλέχθηκαν εκχυλίσματα τα οποία αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης Western με τη χρήση του αντισώματος anti-I2PP2A. Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των εντάσεων των ζωνών έγινε με το πρόγραμμα Quantity One. Η κανονικοποίηση των τιμών όπως αποδίδονται στο διάγραμμα σε αυθαίρετες μονάδες, έγινε σε σχέση με την α τουμπουλίνη.



### Παράρτημα 3

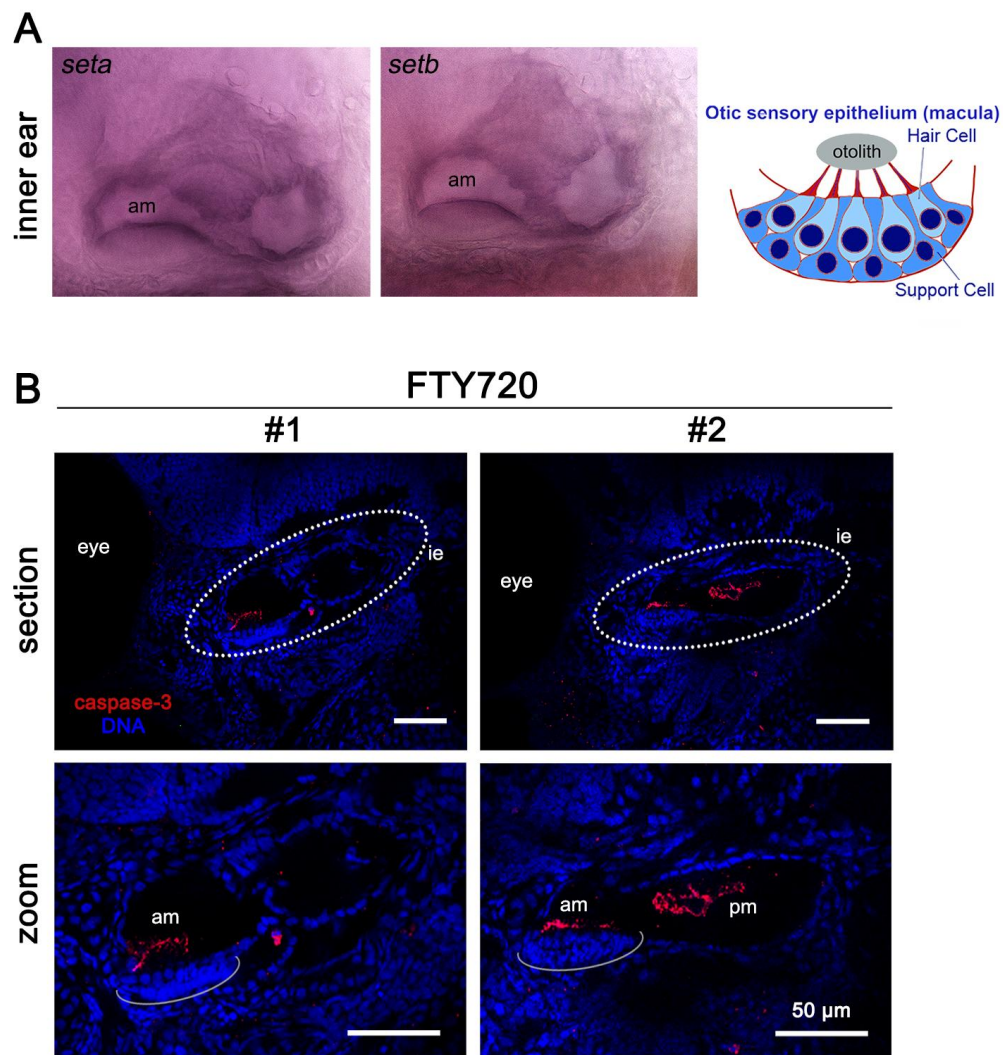
#### Ανάλυση της επίδρασης του φαρμάκου FTY720 στην έκφραση πρωτεϊνών

Ελέγχθηκε η πιθανή επίδραση του φαρμάκου στη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών με βασικότερες τις Seta/b. Πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση Western σε εκχυλίσματα προνυμφών 4 dpf μετά από έκθεση σε 5 και 10  $\mu\text{M}$  FTY720, όπου για την ανίχνευση των επιπέδων των Seta/b χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-I2PP2A. Όπως αναμενόταν, καμία αξιόλογη μεταβολή δεν διαπιστώθηκε στα επίπεδα των δύο πρωτεϊνών (Εικόνα 2). Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα και στην περίπτωση της φωσφατάσης PP2A όπου αναλύθηκε η έκφραση της καταλυτικής της υπομονάδας με τη χρήση του αντισώματος anti-PP2A-Ca/ $\beta$ . Η επιλογή ελέγχου του συγκεκριμένου ενζύμου έγινε αφενός γιατί αναστέλεται από τη SET μετά από πρόσδεση της τελευταίας στην καταλυτική του υπομονάδα και αφετέρου γιατί ενεργοποιείται από το FTY720. Και στις δύο περιπτώσεις αυτό που επηρεάζεται είναι η δραστηριότητα του ενζύμου και όχι η έκφρασή του όπως άλλωστε φαίνεται και στην Εικόνα 2. Σε αυτήν την περίπτωση η διαφορά στην δράση της PP2A θα πρέπει να μελετηθεί με την αντίστοιχη δοκιμασία ενζυμικής ενεργότητας. Λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο των Seta/b στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και γνωρίζοντας πως σε αυτό ασκεί δράσεις και το φάρμακο FTY720 (Anastasiadou and Knoll, 2016; Hait *et al.*, 2014), ελέγχθηκαν τα επίπεδα ακετυλίωσης της  $\alpha$  τουμπουλίνης, χαρακτηριστικής τροποποίησης του κυτταροσκελετού των νευρικών κυττάρων, με το αντίστοιχο αντίσωμα. Ομοίως και εδώ, δεν βρέθηκε αξιόλογη μεταβολή των επιπέδων ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (Εικόνα 2), πέραν μιας μικρής αύξησης ειδικότερα στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, η οποία όμως δεν κρίνεται σημαντική.



Εικόνα 2. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Seta/b, PP2A-Ca/ $\beta$  και της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, σε κυτταρικά εκχυλίσματα προνυμφών zebrafish 4 dpf μετά από έκθεσή τους σε 5 και 10  $\mu\text{M}$  FTY720. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με τα αντισώματα anti-I2PP2A, anti-PP2A-Ca/ $\beta$ , anti-acetylated tubulin και anti- $\alpha$  tubulin για τον έλεγχο ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των εντάσεων των ζωνών έγινε με το Quantity One και η κανονικοποίηση των τιμών έγινε σε σχέση με την  $\alpha$  τουμπουλίνη.

Ανάλυση της επίδρασης του φαρμάκου FTY720 στο έσω ους προνυμφών zebrafish



**Εικόνα 3.** (A) Ανάλυση της κατανομής των μεταγράφων των γονιδίων *seta* και *setb* στο έσω ους προνυμφών zebrafish, στο στάδιο των 4 dpf. Η έκφραση των mRNAs ανιχνεύεται στην κορυφαία πλευρά της εμπρόσθιας ακρολοφίας (am) εντός του ωτικού κυστιδίου. Δεξιά φαίνεται σχηματικά η μορφολογία της αισθητήριας κηλίδας που αποτελείται από στηρικτικά (support cell) και κροσσωτά κύτταρα (hair cell) πάνω στα οποία βρίσκεται ο ωτόλιθος. (B) Μελέτη απόπτωσης στο έσω ους προνυμφών 4 dpf που έχουν εκτεθεί στο φάρμακο FTY720. Ανοσοφθορισμός προνυμφών zebrafish 4 dpf μετά από έκθεση σε 5 μM FTY720, με τη χρήση του αντισώματος anti-active caspase 3. Η χρώση των πυρήνων έγινε με TOPRO-3. Εντός περιγράμματος διακρίνεται το ωτικό κυστίδιο το οποίο εντοπίζεται οπίσθια των οφθαλμών (πλευρική όψη). (Κάτω, zoom) Οι αντίστοιχες τομές προβάλλονται σε μεγέθυνση για την καλύτερη παρατήρηση των επιμέρους δομών. Αυξημένη απόπτωση παρατηρείται τόσο στην εμπρόσθια κηλίδα (#1-2) όσο και στην οπίσθια (#2). Γραμμή κλίμακας 50 μm. ie: έσω ους, am: εμπρόσθια κηλίδα, pm: οπίσθια κηλίδα

## Παράρτημα 4

### Ανάλυση μεταγραφικού προτύπου των MOab morphants μέσω μικροσυστοιχιών

Από το σύνολο των διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων που αποκάλυψε η ανάλυση των μικροσυστοιχιών, το ενδιαφέρον εστιάστηκε σε συγκεκριμένα γονίδια γνωστά για τη δράση τους στην ανάπτυξη των οργάνων του αισθητήριου συστήματος. Η αύξηση ή μείωση των επιπέδων έκφρασης των εν λόγω γονιδίων αποτυπώνεται στον παρακάτω Πίνακα, όπου με χρώμα επισημαίνονται τα γονίδια που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση και επιβεβαίωση μέσω qPCR.

**Πίνακας 1.** Ανάλυση μικροσυστοιχιών. Λίστα γονιδίων με ρόλο στην ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων.

Gene ID	Gene	Gene description	Fold Change	p-value
<b>Down-regulated genes</b>				
58216	<i>atoh7</i>	atonal homolog 7	0.10	2.29E-06
494051	<i>tectb</i>	tectorin beta	0.22	4.80E-04
81881	<i>crx</i>	cone-rod homeobox	0.24	2.12E-03
30463	<i>lhx1a</i>	LIM homeobox 1a	0.28	8.91E-06
30625	<i>six7</i>	sineoculis homeobox homolog 7	0.29	1.26E-03
567024	<i>lgsn</i>	lengsin,lens protein with glutamine synthetase domain	0.32	3.33E-03
266958	<i>neurod4</i>	neurogenic differentiation 4	0.36	3.86E-06
100000769	<i>cryaa</i>	crystallin,alphaA	0.36	1.69E-03
30169	<i>neurod</i>	neurogenic differentiation	0.37	1.58E-04
553420	<i>mipb</i>	major intrinsic protein of lens fiber b	0.37	2.85E-03
30473	<i>rx2</i>	retina lhomeobox gene 2	0.42	1.49E-02
560032	<i>dvl1b</i>	dishevelled,dsh homolog 1b (Drosophila)	0.46	3.66E-05
100149794	<i>akt3</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3(protein kinaseB, gamma)	0.47	2.03E-05
405850	<i>foxg1b</i>	forkhead box G1b	0.48	1.90E-04
393476	<i>prpf31</i>	PRP31pre-mRNA processing factor 31 homolog (yeast)	0.49	3.35E-04
60639	<i>pax6b</i>	paired box gene 6b	0.51	2.07E-04
30465	<i>lhx5</i>	LIM homeobox 5	0.53	1.29E-03
555242	<i>foxp2</i>	forkhead box P2	0.53	1.13E-03
402999	<i>irx4a</i>	iroquois homeobox protein 4a	0.54	1.32E-04
30679	<i>prox1a</i>	prospero-related homeobox gene 1a	0.54	3.96E-04
117234	<i>mab21l2</i>	mab-21-like2	0.54	1.81E-03
335625	<i>adcyp1b</i>	adenylate cyclase activating polypeptide1b	0.56	2.12E-02
100526651	<i>tcf4</i>	transcription factor 4	0.57	2.06E-04
436788	<i>cdk5r1b</i>	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1b (p35)	0.57	2.43E-04
368483	<i>nsfa</i>	N-ethylmaleimide-sensitive factor a	0.58	2.74E-04

100529120	<i>smoc1</i>	SPARC related modular calcium binding 1	0.58	1.27E-04
30316	<i>otpb</i>	orthopedia homolog b	0.30	2.65E-04
30212	<i>gsc</i>	goosecoid	0.31	3.27E-04
560759	<i>otpa</i>	orthopedia homolog a	0.32	7.42E-04
<b>Up-regulated genes</b>				
792456	<i>ovoll</i>	ovo-like1 (Drosophila)	1.75	3.00E-03
30128	<i>wnt1</i>	wingless-typeMMTV integration site family, member1	1.82	6.37E-03
353313	<i>foxl1</i>	forkhead box i1	1.86	2.21E-04
266992	<i>cad</i>	carbamoyl-phosphate synthetase 2	1.88	1.26E-03
767737	<i>foxj1a</i>	forkhead box J1a	1.93	3.13E-03
30538	<i>fgf8a</i>	fibroblast growth factor 8a	2.00	2.56E-04
60632	<i>wnt3a</i>	wingless-typeMMTV integration site family, member3A	2.11	2.15E-03
568941	<i>oc90</i>	otoconin 90	2.24	3.91E-04
445189	<i>optc</i>	opticin	2.60	2.76E-03
407086	<i>junba</i>	junB proto-oncogene a	2.72	1.95E-03
100004116	<i>fsta</i>	follistatin a	2.96	5.62E-05
100151416	<i>cdkn1a</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor1A	4.68	1.59E-05
560210	<i>hsp70l</i>	heat shock cognate70-kd protein,like	8.05	1.48E-03

### ☞ Εκκινητές qPCR

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα γονίδια που αναλύθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους με τη μέθοδο της qPCR. Περιλαμβάνονται οι αριθμοί ταυτοποίησης των γονιδίων στη βάση δεδομένων NCBI και οι αντίστοιχες αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 2.** Αλληλουχίες πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών των γονιδίων που αναλύθηκαν με qPCR.

Gene	Gene ID	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Product size
<i>seta</i>	323501	GGCCGCTGGAAGTTTGTCTA	CTCGGCGAGGTAGAAGATCG	92
<i>setb</i>	321714	AGCCTCTCCTGTCTGACCATGT	ACGCAAGAGGCTTCAGCAACGA	102
<i>crx</i>	81881	ATGCTGTGAACGGGTTAAC	AAGCTTCCAGAATGTCCAG	138
<i>optc</i>	445189	ACCTGACACAGGCTTAGGGAT	TGAAGTCTGCGGCTTTGATCT	167
<i>six7</i>	30625	CACCGGTTTACACGCGAATC	AGACTGCGGGTTCTCTCCTTA	197
<i>cryaa</i>	100000769	ACTCAGGTGTCTCTGAGGTGA	CTGGTCCACATTGGAAGGCA	206
<i>atoh7</i>	58216	CCGAGAAGTTTGAGAGTGC	GCTCAGAGCCATCTGTAGGG	168
<i>neurod4</i>	266958	CCTTCGGTGGAAAGTGTGGA	GGTTTGGTCATCATTGTGATCTGT	162
<i>neurod</i>	30169	CCCTGCGTCATTCCATGCTACCC	AGGACGGGAATTGTGCAACTCTGC	181
<i>junba</i>	407086	AGCTTCAGTACGTCCCAACG	TCTTGAGGTTCCGGTAGGGT	176

<i>ovoll</i>	792456	ACGAGCTTTCCTGGTGAAGA	CGGTCTTTGTGTGTGGACAG	140
<i>slc12a3</i>	565439	ACCATTGGCTCCTGTGTGGTGC	TGCAGCCCACTCCCAGACT	91
<i>foxj1a</i>	767737	TTCTGGAAAATCGACCCGCA	TGAGCGTTCATCCTGAGTCG	119
<i>foxi1</i>	353313	CCAGAACGCGCAGGATAAGA	CATCCTCATCCCCTGCAACT	161
<i>oc90</i>	568941	ATGAAAACCTGGATTGTACGACTG	GCAGTGCTGTGAACTTTCTG	91
<i>cdkn1a</i>	100151416	AGCTTCAGGTGTTCTCAGC	GTGACAATATGTTTTGAGCTTCTGC	132
<i>akt3</i>	100149794	TTCTCTGTGCGCAAGTGTCA	ACCATCTGAATGGCCTCGAC	155
<i>gsc</i>	30212	TCCAGCGCCGAACCTACAAT	GCGCTGTCATAACCTGTAGGA	162
<i>otpa</i>	560759	CGGTCTGCAACTCTACTGGATG	TACTGTTGACCGCTACACCC	212
<i>otpb</i>	30316	AGTGCGCAATGCTCTCTCAT	GCATCCTTCATCCAGTGGAGTT	97
<i>atoh1a</i>	30303	GGACCGATCTCCAGAGGAT	CGAGTCTTTACTGGCCTCCG	160
<i>atoh1b</i>	493915	TGACAAGCTGAGAAGCGTCA	CCGAAGTTGCGTCAATAGCG	182

