

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS

VIKTORIJA GRAJEVSKAJA

DANIO RERIO (HAMILTON, 1822) ŠIRDIES IR KRAUJAGYSLIŲ
SISTEMOS VYSTYMO SI IR REGENERACINIŲ MECHANIZMŲ TYRIMAI

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, zoologija (05 B)

Vilnius, 2017 metai

Disertacija rengta Vilniaus universitete 2010 – 2014 metais studijuojant doktorantūroje ir ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas – dr. Darius Balčiūnas (Temple universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Zoologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas – dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

Nariai:

prof. dr. Dainius Haroldas Pauža (Lietuvos sveikatos universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B);

prof. dr. Franco Cotelli (Milano universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B);

prof. dr. Donatas Žvingila (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B);

dr. Dalius Butkauskas (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B).

Disertacija bus ginama viešame Zoologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 m. sausio mėn. 30 d. 13 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre.

Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2016 m. gruodžio mėn. 30 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto, Gamtos tyrimų centro bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

Santrumpų sąrašas	5
Įvadas.....	8
Darbo naujumas ir reikšmė.....	12
1. Tyrimų metodika.....	14
1. 1. Inscerinių mutantų identifikacija panaudojant aPGR ir 5'RACE metodus...	14
1. 2. Kraujagyslių regeneracijos tyrimai <i>fli1b^{tp150}</i> insceriniuose mutantuose.....	17
1. 3. Transgeninių kamienų kūrimas, atranka ir auginimas.....	19
1. 4. <i>tbx5a^{tp158}</i> mutacijos reversija <i>in vivo</i> naudojant Flp ^o rekombinazę.....	20
1. 5. Sąlyginė <i>tbx5a^{tp158R}</i> lokuso re-mutacija <i>in vivo</i> naudojant Cre rekombinazę.....	21
1. 6. Širdies regeneracijos tyrimai: dalinė skilvelio amputacija, skrodimai, histologinių preparatų ruošimas ir dažymas.....	22
1. 7. Statistinė analizė.....	24
2. Svarbiausi rezultatai ir jų aptarimas.....	25
2. 1. Inscerinių mutantų identifikacija	25
2. 2. Kraujagyslių regeneracija <i>fli1b^{tp150}</i> insceriniuose mutantuose	27
2. 3. <i>tbx5a^{tp158}</i> lervų ir suaugėlių morfologinė/ anatominė bei genotipinė analizė..	30
2. 4. Morfologinių/ anatominių defektų “kompensavimas” <i>tbx5a^{tp158}</i> ir <i>tbx5a^{hst}</i> mutantuose naudojant bakterijų dirbtinę chromosomą su <i>tbx5a</i> genu	33
2. 5. Normalaus vystymosi atstatymas revertuojant <i>tbx5a^{tp158}</i> mutaciją su Flp ^o rekombinaze.....	35
2. 6. -3. <i>nkx2.5</i> ir -6. <i>nkx2.5</i> aktyvumo analizė normalaus širdies vystymosi metu.....	37
2. 7. Viščiuko β-globino insuliatorių veiklos analizė žuvies genome normalios kardiogenezės metu.....	40
2. 8. Sąlyginė <i>tbx5a^{tp158R}</i> lokuso re-mutacija besivystančios ir suaugusios žuvies širdyje.....	43
2. 9. Širdies regeneracijos tyrimai <i>tbx5a^{tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}</i> sąlyginiuose mutantuose.....	44

2. 10. Naujo minimalaus <i>tbx5a</i> stipriklio charakterizavimas <i>in vivo</i>	48
Išvados.....	52
Naudotų literatūros šaltinių sąrašas.....	54
Mokslinės publikacijos.....	62
Dalyvavimas mokslinėse konferencijose.....	62
Santrauka (Anglų kalba).....	63
Trumpos žinios apie disertantę.....	66

Santrumpų sąrašas

aPGR - atvirkštinė Polymerazės Grandininė Reakcija
ba - prieš amputaciją
ba - žiauniniai lankai
BAC - Bakterijų Dirbtinė Chromosoma
BFP - Mėlynas Fluorescentinis Baltymas
bp - bazių pora
CreER^{T2} - Cyclization recombination protein fused to a triple mutant of the human Estrogen Receptor, Tamoxifen-inducible
crygc - *crytallin*, *gamma c*
DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DNR - Deoksiribonukleorūgštis
dpa - dienų po amputacijos
dpc - dienų po apvaisinimo
dpf - dienų po apvaisinimo
e - akis
ENU - *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea
Ensembl - ENS European Molecular Biology Laboratory (genominė duomenų bazė)
fb - priekinės smegenys
Fgf - Fibroblast growth factor
fli1a - *friend leukemia integration 1a*
fli1b - *friend leukemia integration 1b*
fli1b^{tp150} - *tp150* mutacija *fli1b* gene
Flp^o - *Flip*, kodono optimizuotas
FP - Fluorescentinis Baltymas
FRT - Flp Recombinase Recognition Target
GFP - Žalias Fluorescentinis Baltymas

h - širdis
hb - užpakalinės smegenys
Hh - Hedgehog
HOS - Holt Oramo Sindromas
hsp - *heatshock*
hst - *heartstrings*
hpf - valandų po apvaisinimo
INS - viščiuko β -globino insuliatorius
loxP - locus of crossing-over X of P1
mb - vidurinės smegenys
mRFP - monomerinis Raudonas Fluorescentinis Baltymas
MS222 - Tricane Methanesulfonate
nkx2.5 - *NK2 homeobox 5*
PBS - Fosfato Buferinis Druskos tirpalas
pdlim7 - *PDZ and LIM domain 7*
PFA - Paraformaldehidas
poly(A) - poliadenilinimo seka
pp(A) - *ocean pout antifreeze baltymo poliadenilinimo seka*
RA - Retino Rūgštis
RNR - Ribonukleino Rūgštis
RT PCR - Atvirkštinės Transkripcijos Polymerazės Grandininė Reakcija
S1 - Switchblade 1
SA - Sukirpimo Akceptorius
sc - nugaros smegenys
tbx3a - *T-box transkripcijos faktorius 3a*
tbx5a - *T-box transkripcijos faktorius 5a*
tbx5a^{hst} - *heartstrings* mutacija *tbx5a* gene
tbx5a^{tpl58} - *tpl58* mutacija *tbx5a* gene
tbx5a^{tpl58R} - reverteruota *tpl58* mutacija *tbx5a* gene

tnnt2a - troponin T type 2a

UAS - Upstream Activating Sequence

UCSC - University of California, Santa Cruz (genominė duomenų bazė)

Wnt - Wingless type MMTV integration site family

YFP - Geltonas Fluorescentinis Baltymas

zp(A) - zebrafish β -aktino transkripcijos terminacijos seka

4-HT - 4-Hidroksitamoksifenas

5'RACE - Rapid Amplification of cDNA Ends

Ivadas

Danio rerio (Hamilton, 1822) yra maža (iki 40 mm) gėlavandenė žuvis, kuri priklauso kaulinių žuvų antklasiui (Osteichthyes), karpžuvių būriui (Cypriniformes), karpinių šeimai (Cyprinidae). Žuvis yra natūraliai paplitusi sekliuose ir stovinčiuose vandenyse, esančiuose aplink Gango ir Bramaputros upių baseinus Šiaurės-Rytų Indijoje, Bangladeše ir Nepale. Dažnai yra aptinkama šalia ryžių laukų. Visaėdė, dažniausiai maitinasi zooplanktonu ir vabzdžiais, taip pat fitoplanktonu, siūliniais dumbliais, augalais, sporomis, bestuburių kiaušiniiais, ir detritu (Spence et al., 2008).

D. rerio žuvis greitai tapo visame pasaulyje pripažinta modeline sistema. Ji pasižymi daugeliu savybių, naudingų širdies ir kraujagyslių sistemos vystymosi tyrimams (Streisinger et al., 1981):

1. Išorinis apvaisinimas ir optinis embrionų permatomumas leidžia atlikti tiesioginius širdies raidos stebėjimus gyvame organizme per visas vystymosi stadijas.
2. Netgi tokiais atvejais, kai funkcionali širdis nebeišsivysto, mažo dydžio embrionas yra aprūpinamas deguonimi pasyvios difuzijos būdu. Taigi net sunkiausi širdies defektai, kurie paprastai sąlygoja kitų stuburinių organizmų embrionų mirtį, gali būti išsamiai analizuojami.
3. *D. rerio* yra būdingas didelis palikuonių skaičius dėtyje. Tai yra ypatingai svarbu atliekant genetinius ir morfologinius tyrimus, kurie leidžia tyrinėti stuburinių gyvūnų širdies vystymosi mechanizmus.

Širdis yra vienas iš pirmųjų organų, kurie išsivysto stuburiniame organizme. *D. rerio* širdies raida vyksta ypatingai greitai (Stainier, 2001). Praėjus dvidešimčiai valandų po apvaisinimo atskiri kardiomiocitai pradeda susitraukinėti. Dvidešimt antrą valandą po apvaisinimo širdis pradeda plakti, o dvidešimt ketvirtą valandą po apvaisinimo išsivysto normali kraujo cirkuliacija (Scott & Yelon,

2010). Dviejų dienų *D. rerio* širdis prilygsta dvylikos dienų pelės ir trisdešimt penkių dienų žmogaus embriono širdžiai (Stainier, 2001).

Per morfogenezę simetriškas širdies diskas, kuris yra sudarytas iš trijų sluoksnių: vidinio endokardiumo, vidurinio (būsimojo skilvelio) miokardiumo ir išorinio (būsimojo prieširdžio) miokardiumo, transformuojasi į asimetrišką linijinį širdies vamzdelį. Dvidešimt antrą valandą po apvaisinimo iš arterinės širdies vamzdelio dalies pradeda formotis skilvelis, o dar po dviejų valandų iš veninės širdies vamzdelio dalies susiformuoja prieširdis (Bakkers, 2011).

Praėjus trisdešimčiai valandų po apvaisinimo prasideda širdies apsisukimo stadija ir susidaro dvi širdies kameros, skilvelis ir prieširdis, kurios tampa morfologiškai atskiriamos tik trisdešimt šeštą valandą po apvaisinimo. Pasibaigus širdies apsisukimo stadijai, pro-epikardiumo ląstelės migruoja širdies link. Susidaro išorinis širdies sluoksnis – epikardiumas. Kai kurios epikardiumo ląstelės migruoja į širdies vidų, kur diferencijuojasi į vainikines kraujagysles ir fibroblastus (Liu & Stainier 2010). Širdies vožtuvai susiformuoja iš endokardiumo (Hu et al., 2000). Penktą dieną po apvaisinimo (toliau tekste dpf) lervos širdis jau pasižymi suaugusios širdies konfigūracija (Lohr & Yost, 2000).

Suaugusios žuvies širdį sudaro keturios dalys: veninis sinusas, prieširdis, skilvelis, ir arterinis gumbas (Hu et al., 2000). Trys širdies vožtuvai užtikrina vienakryptį kraujo tekėjimą (Hu et al., 2001; Menke et al., 2011). Subrendusios širdies prieširdžio ir skilvelio sienelę sudaro trys sluoksniai: endokardiumas, miokardiumas ir epikardiumas (Hu et al., 2001). Subrendusios širdies skilvelio raumuo susideda iš trijų skirtingų sluoksnių: trabekulinio, pirmapradžio ir žievinio (Gupta & Poss, 2012).

Suaugusios *D. rerio* širdis pasižymi stipriomis regeneracinėmis savybėmis (Poss et al., 2002; Raya et al., 2003). Širdies regeneraciniai mechanizmai gali būti tyrinėjami sukeltam tikrus pažeidimus. Šiuo metu širdies pažeidimams sukelti yra naudojami trys standartiniai metodai: dalinė širdies skilvelio amputacija (Poss et al., 2002; Raya et al., 2003), kriopažeidimai (Gonzales-Rosa et al., 2011;

Schnabel et al., 2011; Chablais et al., 2011) ir genetinis ląstelių pašalinimas (Wang et al., 2011). Priklausomai nuo pažeidimo būdo, *D. rerio* širdies regeneracija trunka maždaug nuo vieno iki dviejų su puse mėnesių (Choi & Poss, 2012).

Nors dabar yra sukurta daugybė metodų, kurie yra sėkmingai naudojami *D. rerio* širdies regeneracijos tyrimuose (Gemberling et al., 2013), bet sąlyginė mutagenė žuvų suaugėliuose dar nėra įvykdyta. Sąlyginių mutantų neturėjimas išlieka pagrindiniu *D. rerio* modelinės sistemos trūkumu. Tai apsunkina vystymosi genų funkcijos tyrinėjimus regeneracijos procesuose. Esminių vystymosi signalinių kelių reikšmė širdies regeneracijoje buvo atskleista naudojant du metodus: indukuotą transgeninį slopinimą, kuris buvo vykdomas panaudojus dominuojančio neigiamo poveikio baltymus (Lepilina et al., 2006; Kikuchi et al., 2011; Jopling et al., 2012; Fang et al., 2013; Gupta et al., 2013; Huang et al., 2013; Wang et al., 2013; Zhao et al., 2014), arba farmakogenetinį slopinimą (Lien et al., 2006; Chablais & Jaźwińska, 2012; Jopling et al., 2010; Choi et al., 2013; Huang et al., 2013). Tačiau pažangesnės genetinės strategijos, tokios kaip sąlyginė geno aktyvumo reguliacija, yra būtinos išaiškinti širdies regeneracinius mechanizmus.

Vienas iš potencialių genų, kuris galėtų vaidinti svarbų vaidmenį *D. rerio* širdies regeneracijoje yra *tbx5a* (*T-box transcription factor 5a*). Tbx5 yra transkripcijos faktorius būtinas normaliam širdies vystymuisi visose tyrinėtose stuburinių rūšyse (Basson et al., 1999; Horb & Thomsen, 1999; Brown et al., 2005; Bruneau et al., 2001; Takeuchi et al., 2003; Ahn et al., 2002; Garrity et al., 2002). Ieda ir kolegos (2010) nustatė, kad Tbx5 yra vienas iš trijų transkripcijos faktorių, kurie yra reikalingi tam, kad pelės odos fibroblastai būtų sėkmingai reprogramuoti į kardiomiocitus primenančias ląsteles *in vitro*.

Remiantis *in vivo* tyrimais, suaugusios žuvies širdis pasižymi silpna, bet pastovia *tbx5a* geno raiška (Raya et al., 2003). Be to, Lepilina ir kiti (2006) aptiko, kad *tbx5a* raiška suaugusios žuvies širdies skilvelyje žymiai padidėja 5 ir 7 dieną po dalinės skilvelio amputacijos (toliau tekste dpa). Zhang ir kolegos (2013) nustatė, kad *tbx5a* raiška taip pat yra sustiprinama embrioninėje širdyje per

regeneraciją. Lepilinos ir kitų (2006) atlikti tyrimai taip pat atskleidė, kad dalinė širdies skilvelio amputacija aktyvina epikardiumą, o vėliau buvo parodyta, jog *tbx5a* yra reikalingas pro-epikardiumo specifikacijai (Liu & Stainier, 2010). Taigi remiantis mokslinės literatūros šaltiniais, *tbx5a* genas yra potencialus kandidatas, kuris galėtų vaidinti svarbų vaidmenį širdies regeneraciniuose mechanizmuose.

Darbo tikslas:

Atlikti *Danio rerio* (Hamilton, 1822) širdies ir kraujagyslių sistemos vystymosi bei regeneracijos tyrimus naudojant insercinius *tbx5a^{tp158}* ir *fli1b^{tp150}* alelius.

Darbo uždaviniai:

1. Identifikuoti aštuonius insercinius *D. rerio* kamienus.
2. Ištirti kraujagyslių regeneraciją *fli1b^{tp150}* inserciniuose mutantuose.
3. Nustatyti ar *-3.3nkx2.5* ir *-6.1nkx2.5* fragmentai turi širdžiai specifinių stipriklių, kurie yra aktyvūs normalaus žuvies širdies vystymosi metu.
4. Ištirti ar viščiuko β -globino insuliacinės sekos gali apsaugoti transgeną nuo chromosominės pozicijos efekto *D. rerio* genome normalios kardiogenezės metu.
5. Nustatyti ar *tbx5a^{tp158R}* alelis gali būti sąlyginai re-mutuotas besivystančios ir suaugusios žuvies širdyje.
6. Ištirti širdies regeneraciją sąlyginuose *tbx5a^{tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* mutantuose.
7. Identifikuoti minimalų širdžiai specifinį *tbx5a* reguliacinį elementą panaudojant delecijos analizę.

Ginamieji teiginiai:

1. Inserciniai *D. rerio* kamienai gali būti efektyviai identifikuojami su aPGR ir 5'RACE metodų pagalba.

2. Po pažeidimo, žaliojo fluorescentinio baltymo raiška *fli1b^{tp150}* mutantų uodeginiame peleke padidėja, bet kraujagyslių regeneracija išlieka normali.
3. Abu *-3.3nkx2.5* ir *-6.1nkx2.5* fragmentai turi širdžiai specifinių stipriklių, kurie yra pajėgūs aktyvinti raudono fluorescentinio baltymo raišką normalaus žuvies širdies vystymosi metu.
4. Viščiuko β -globino insuliatoriai neapsaugo *-3.3nkx2.5:RFP /INS* ir *-6.1nkx2.5:RFP/INS* transgenų nuo chromosominės pozicijos efekto žuvies genome normalios kardiogenezės metu.
5. Žuvies embrionų ir suaugėlių inkubavimas 4-hidroksitamoksifeno tirpale indukuoja sąlyginę *tbx5a^{tp158R}* alelio re-mutaciją širdyje.
6. Sąlyginiai *tbx5a^{tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* mutantai pasižymi sutrikusia širdies regeneracija.
7. Minimalus 177 bp *tbx5a* stipriklis aktyvina širdies specifinę raudono fluorescentinio baltymo raišką besivystančioje ir suaugusioje žuvyje.

Darbo naujumas ir reikšmė

Visi tyrimai, kurie buvo atlikti šio mokslinio darbo metu, pasižymi naujumu ir turi svarbią reikšmę įvairioms biomedicinos mokslo šakoms: zoologijai, genetikai, genų inžinerijai, vystymosi biologijai ir regeneracinei medicinai. Identifikuoti šeši nauji inserciniai *D. rerio* kamienai. Visi šie mutantai yra prieinami mokslo bendruomenei ir gali būti naudojami tiriant įvairius biologinius procesus. Nustatyta, kad viename iš identifikuotų kamienų, *fli1b^{tp150}*, žalio fluorescentinio baltymo (GFP) raiška kraujagyslėse ir kraujyje žymiai padidėja 7-ą dieną po dalinės uodeginio peleko amputacijos. Be to, atlikti stebėjimai atskleidė, kad iš pradžių uodegos ataugimas *fli1b^{tp150}* homozigotose yra netolygus, bet galiausiai regeneravęs pelekas atrodo visiškai normalus. Šie stebėjimų rezultatai suteikia svarbią informaciją apie *fli1b* geno raiškos ir

uodeginio peleko morfologinius pokyčius, kurie vyskta per pirmąsias keturias savaites po uodegos pažeidimo. Gauti duomenys gali būti naudingi tolimesniems kraujagyslių regeneracijos tyrimams stuburiniuose organizmuose.

Viščiuko β -globino insuliatorių veiksmingumas buvo pirmą kartą ištirtas F1 ir F2 *D. rerio* lervose. Gauti duomenys sudaro vertingą pagrindą transgeninėms konstrukcijoms kurti. Pastebėta teigiama insuliacinių sekų įtaka transgeno raiškos pasiskirstymui, margumui ir ryškumui turi svarbią reikšmę tolimesniam genų reguliacijos mechanizmų išsiaiškinimui eukariotų genome. Atliktos -3.3*nkx2.5* ir -6.1*nkx2.5* promotoriaus fragmentų analizės rezultatai yra naudingi tolimesnei *nkx2.5* geno stipriklių ir slopintuvų identifikacijai per stuburinių gyvūnų vystymąsi.

Nustatyta širdžiai specifinė *tnnt2a:CreER^{T2}* raiška suteikia papildomą transgeną, kuris gali būti sėkmingai naudojamas sąlyginei rekombinacinių įvykių indukcijai besivystančios ir suaugusios žuvies širdies ląstelėse. Ypatingai svarbią reikšmę turi darbo metu įvykdyta pirmoji pasaulyje sąlyginės mutacijos indukcija suaugusioje žuvyje. Atlikti tyrimai parodė, kad insercinė *tpl58* mutacija *tbx5a* gene gali būti sėkmingai indukuojama *tbx5a^{tpl58R/+};tnnt2a:CreER^{T2}* ir *tbx5a^{tpl58R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* suaugėlių širdyje. Mutacijos, kurios gali būti kontroliuojamos laike ir erdvėje, yra būtinos esminėms vystymosi genų funkcijoms išsiaiškinti stuburinių gyvūnų regeneracijoje. Taip pat sąlyginės mutacijos yra labai vertingos genų antrinėms funkcijoms nustatyti. Atliekant tyrimus pirmą kartą buvo atskleista, kad *tbx5a* genas turi esminę funkciją žuvies širdies regeneraciniuose mechanizmuose.

Nors ir yra atlikta daug tyrimų, parodančių *tbx5* vaidmens svarbą stuburinių vystymuisi, vis dar trūksta mokslinių žinių apie šio geno reguliaciją. Disertacijos tyrimų metu buvo identifikuotas minimalus *tbx5a* stipriklis, kuris sąlygoja mRFP raišką besivystančios ir suaugusios žuvies širdyje. Šis atradimas yra vertingas indėlis į tyrimus, siekiančius ištirti *tbx5a* geno veiklos reguliacijos pagrindus,

kurie leistų geriau suprasti stuburinių gyvūnų širdies regeneracijos mechanizmų ypatumus.

1. Tyrimų metodika

1. 1. Insercinių mutantų identifikacija panaudojant aPGR ir 5'RACE metodus

Kandidatiniai mutantiniai aleliai, gauti insercinės mutagenozės būdu Dr. Balčiūno laboratorijoje, buvo identifikuoti panaudojus du metodus: atvirkštinę polimerazės grandininę reakciją (aPGR) (Hermanson et al., 2004; Clark et al., 2011) ir 5' kDNR galo greitąją amplifikaciją (5'RACE) (Clark et al., 2004; Clark et al., 2011).

Penkių dienų F1 lervos buvo atrenktos ir sugrupuotos pagal fluorescentinio baltymo (FP) raiškos buvimą. Atskiros lervų grupės, kurias sudarė 20 FP-teigiamų arba 20 FP-neigiamų embrionų, buvo užšaldomos -80°C temperatūroje. Norint atlikti aPGR, embrionų genomine DNR buvo išskiriama pagal standartinį protokolą (Hermanson et al., 2004). 5'RACE metodui, lervų RNR buvo išskiriama naudojant "Absolutely RNA miniprep kit" rinkinį (Agilent Technologies).

aPGR metodą sudaro trys dalys: genomines DNR "karpymas" su restrikcijos endonukleazėmis, "sukarpytos" DNR fragmentų ligavimas, genų gaudyklę apsupančių genominių sekų amplifikacija. Išskirta genomine DNR buvo praskiesta iki 0.67 µg /µl ir panaudota restrikcijai, kurios metu DNR atskiruose mėgintuvėliuose buvo sukarpyta 4 enzimų grupėmis: N (NlaIII), T (Taq), X (AvrII, NheI, SpeI, XbaI) ir B (BamHI, BgIII, BcII). Restrikcijos mišiniai su N, X ir B grupių enzimais buvo laikomi +37°C temperatūroje, o restrikcijos mišinys su TaqI enzimu buvo inkubuotas +65°C temperatūroje. Praėjus 4 valandoms, 10 µl kiekvieno restrikcijos mišinio buvo paleista ant 1% agarozės gelio. Likusieji 10 µl buvo užšaldyti -20°C temperatūroje.

Gauti DNR fragmentai buvo liguojami per naktį + 4°C temperatūroje. Kitą dieną 5 µl suligautos žiedinės DNR buvo panaudojami kaip šablonas abiejų genų gaudyklės galų amplifikacijai su PGR1, kurios metu buvo naudojamos dvi pradmenų poros: Tol2-F8 (5′) (5′-TCAAGTAAGATTCTAGCC AGATAC-3′) ir B1/5′No1 (5′-CTAGAGATTCTTGTTTAAGCTGTAG-3′), arba Tol2-R3 (3′) (5′-ACTGGGCATCAGCGCAATTCAATT-3′) ir B1/3′No1 (5′-CAGGGTAATA TAACTTCGTATAGCA-3′). Vėliau 0.5 µl PGR1 produkto buvo panaudojami kaip matrica 5′ ir 3′ genų gaudyklės galų amplifikacijai su PCR2, kurios metu buvo naudojamos dvi pradmenų poros: Tol2-F10 (5′) (5′-AAGTGAAAGTACAA GTACTTAGG-3′) ir B1/5′No2 (5′-TGTATGCTATACGAAGTTATCAGCA-3′), arba Tol2-R4 (3′) (5′-ATAATACTTAAGTACAGTAA TCAAG-3′) ir B1/3′No2 (5′-GCATACATTATACGAAGTTATCGTT-3′). Naudotų pradmenų poros buvo specifinės vienam iš dviejų transpozono galų (5′ arba 3′). Tos pačios poros pradmenų sekos buvo nukreiptos atvirkštine kryptimi viena kitos atžvilgiu. Tai leido amplifikuoti žiedinės DNR molekulėje esančias sekas: genomines DNR fragmentą, kuris apsupa transpozoną iš 5′ arba 3′ galo, bei vieną iš genų gaudyklės galų.

PGR2 produktų analizė buvo atlikta panaudojus 1% gelio elektroforezę. PGR2 mėginiai, gauti amplifikavus DNR iš FP-teigiamų ir FP-neigiamų tos pačios dėties embrionų, buvo supilami į gretimus agarozės gelio takelius. Takeliai, kuriuose buvo paleisti PGR2 produktai amplifikuoti naudojant vienos dėties FP-teigiamų ir FP-neigiamų lervų DNR, buvo lyginami tarpusavyje. Kai stebimos juostos abiejose grupėse (FP-teigiamuose ir FP-neigiamuose) pasižymėjo vienodu dydžiu ir intensyvumu, tai nurodė integraciją, kuri nebuvo sukibusi su fluorescencija. Kai juosta buvo stebima tik “FP-teigiamame” takelyje, tai leido manyti, kad tarp integracijos ir fluorescencijos yra sąsaja.

Juostos, būdingos tik “FP-teigiamam” takeliui, buvo iškerpamos, išskiriamos iš gelio (GeneJET Gel extraction Kit, ThermoFisher Scientific), ir nusiunčiamos sekoskaitai (Genewiz[®]) su genų gaudyklei specifiniu pradmeniu:

Tol2-F10 (5') arba Tol2-R4 (3'). Vienodo ilgio, bet skirtingo intensyvumo juostų atveju, kai "FP-teigiamame" takelyje juosta buvo žymiai ryškesnė, atsirasdavo galimybė, kad tarp FP-neigiamų embrionų pateko vienas arba keli FP-teigiami embrionai. Tokios ryškios juostos irgi buvo iškerpamos, išskiriamos iš gelio ir nusiunčiamos sekoskaitai.

Gautos sekos buvo patikrinamos UCSC (University of California, Santa Cruz) and Ensembl (ENS European Molecular Biology Laboratory) genomine duomenų bazėse. Kai įvesta DNR seka atitikdavo regioną žinomame arba potencialiame gene, toliau buvo nustatoma genų gaudyklės kryptis ir patikrinamas skaitymo rėmelis. Jeigu transpozono geno atžvilgiu integravosi ta pačia kryptimi ir skaitymo rėmelis nebuvo paslinkęs, tai rodė, kad bent teoriškai Gal4 sulietas transkriptas galėjo būti sukuriamas. Toks transkriptas vėliau galėtų būti transliuojamas į Gal4 sulietą baltymą, kurio sudėtyje yra veikiantis Gal4 domenas.

Genotipavimui skirti pradmenys (5' genomis pradmuo ir 3' genomis pradmuo) buvo kuriami prieš ir po potencialios integracijos vietos esančiuose ~500 bp ilgio regionuose. Vėliau ant "FP-teigiamų" ir "FP-neigiamų" embrionų DNR buvo atliekama PGR, kuriai įvykdyti buvo panaudotos dvi pradmenų poros: 5' genomis pradmuo ir Tol2-F10 (5'), 3' genomis pradmuo ir Tol2-R4 (3'). PGR produktas buvo leidžiamas agarozės gelyje. Kai gelyje stebimos juostos dydis atitikdavo teorinį dydį, juosta buvo iškerpama, išskiriama iš gelio ir skaitoma su 5' genominiu pradmeniu arba 3' genominiu pradmeniu. Gautos sekos buvo vėl patikrinamos genomine duomenų bazėse. Jeigu buvo surandamas atitiktuo, tai patvirtindavo tikslią transpozono integracijos vietą. Tokiu būdu buvo identifikuojamas genas, kuris yra mutuoatas analizuojamame inserciniame kamiene.

Tai atvejais, kai aPGR metodu integracijos aptikti nepavykdavo, buvo naudojamas alternatyvus insercinių mutacijų identifikacijos būdas, 5'RACE. Skirtingai negu aPGR, 5'RACE metodas neleidžia nustatyti tikslios transpozono integracijos vietos. Toks būdas leidžia aptikti 5' endogeninius egzonus, kurie

yra sulieti su egzogenine Gal4 seka. RNR (250 - 500 ng), išskirta iš FP-teigiamų ir FP-neigiamų embrionų grupių, buvo naudojama kDNR sintezei su Superscript™ II atvirkštine transkriptaze (Invitrogen). Gauta kDNR buvo naudojama kaip PGR matrica su pradmenų mišiniu, KJC-002 (5'-AATGGCTTCCGAGACCTGCTGTCCAAGTTCGTACAAAAAAGCAGGC-3') ir KJC-003 (5'-AATGGCTTCCGAGACCTGCTGT-3'), bei Gal4-R2 pradmeniu (5'-TTCTTCAGACACTTGCCGCACTTCG-3'). Dešimt kartų praskiestas PGR1 produktas buvo naudojamas kaip matrica PGR2 su KJC-004 (5'-GAGACCTGCTGTCCAAGTTCGT-3') ir Gal4-R3 (5'-TAAGTCGGCAAATATCGCATGCTTG-3'). Gauti 5'RACE PGR produktai buvo leidžiami agarozės gelyje. Juostos, esančios tik "FP-teigiamame" takelyje, buvo iškerpamos, išskiriamos iš gelio ir nusiunčiamos sekoskaitai su Gal4-R3 pradmeniu.

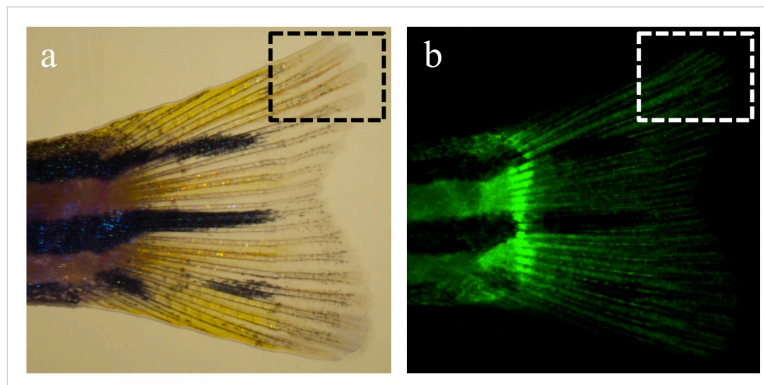
Kai su fluorescencija sukibusi genų gaudyklės integracija buvo sėkmingai identifikuota (su aPGR arba 5'RACE), Gal4 mRNR sulieto transkripto egzistavimo patvirtinimui buvo atliekamas RT PGR ir gauti produktai nusiunčiami sekoskaitai. RNR (250 - 500 ng), išskirta iš FP-teigiamų ir FP-neigiamų embrionų grupių, buvo naudojama kDNR sintezei su Superscript™ III atvirkštine transkriptaze (Invitrogen) ir atsitiktiniais heksamerais. Vienas µl paruoštos kDNR buvo naudojamas kaip PGR matrica su 5' genominiu pradmeniu (būdingu endogeniniam egzonui, esančiam iš 5' pusės nuo transpozono integracijos vietos) ir Gal4-R3. Mėginiai buvo leidžiami agarozės gelyje, juostos iškerpamos, išsikiriamos iš gelio ir nusiunčiamos sekoskaitai. Tokiu būdu buvo patikrinama, kad tikrai susidaro su Gal4 sulietas transkriptas.

1. 2. Kraujagyslių regeneracijos tyrimai *fli1b*^{tp150} inserciniuose mutantuose

Norint patikrinti, ar *fli1b* genas yra reikalingas *D. rerio* kraujagyslių regeneracijai, negenotipuotų individų grupė, gauta sukryžminus *fli1b*^{tp150/+} žuvis, buvo panaudota tyrimams. Suaugusios žuvis buvo anestezuojamos 0.892 mM

MS222 tirpale. Praėjus trims minutėms, žuvis buvo įdedama į mažą Petri lėkštutę kairiaja lateraline puse į viršų. Vėliau į lėkštutę buvo įpilami penki mililitrai vandens. Petri lėkštutėje esanti žuvis buvo padedama po ZEISS Axio IMAGER.A1 mikroskopu tokiu būdu, kad viršutinė distalinė uodeginio peleko dalis atsidurtų mikroskopo matymo lauke.

Šviesinės ir fluorescentinės viršutinės distalinės uodeginio peleko dalies nuotraukos (1 pav.) buvo padaromos NIKON SPOT RT3 kamera prieš pat peleko amputaciją (ba). Maždaug 60% distalinės uodegos dalies buvo nukerpama su mažomis aštriomis žirkutėmis. Amputuoti audiniai buvo užšaldomi ir vėliau naudojami DNR išskirti. Suaugėlių genotipavimui buvo atliekamas trijų pradmenų PGR, kuriam buvo naudojami du genominiai pradmenys, *fli1b-int1-F1* (5'-CGTCAACTTCTGCTTTCTTTTCG-3') ir *fli1b-int1-R1* (5'-TAACCACAGGC ACTGTCACG-3'), bei vienas genų gaudyklei specifinis pradmuo, Tol2-F10 (5' (5'-AAGTGAAAGTACAAGTACTTAGG-3') (Craig et al. 2015).



1 paveikslas. Siekiant ištirti kraujagyslių regeneraciją *fli1b^{tp150}* mutantuose, buvo padaromos šviesinės (a) ir fluorescentinės (b) regeneruojančio uodeginio peleko nuotraukos. Dėžutė, apibrėžta viršutiniame dešiniajame abiejų nuotraukų kampe, parodo uodeginio peleko dalį, kuri buvo fotografuojama ir analizuojama.

Regeneruojančio uodeginio peleko morfologijos bei fluorescentinio baltymo raiškos stebėjimai buvo atliekami keturių skirtingų regeneracijos stadijų

metu: 0, 7, 14 ir 21 dieną po amputacijos (dpa). Kiekvieno stebėjimo metu buvo padaromos šviesinės ir fluorescentinės uodeginio peleko nuotraukos. Kadangi visada buvo naudojami vienodi mikroskopo ir kameros nustatymai (padidėjimas, ekspozicijos laikas ir t. t.), padarytos nuotraukos galėjo būti palyginamos tarpusavyje uodeginio peleko dydžio, pigmentacijos ir fluorescentinio baltymo raiškos (GFP arba mRFP) atžvilgiu.

1. 3. Transgeninių kamienų kūrimas, atranka ir auginimas

Disertacijos tyrimų metu buvo sukurta 16 transgeninių konstrukcijų. Dvi konstrukcijos (pVG2 ir pVG3) buvo skirtos *nkx2.5* promotoriaus ir viščiuko β -globino insuliacinių sekų analizei. Dešimt konstrukcijų (pVG11 - pVG21) buvo panaudota *tbx5a* minimaliam stiprikliui identifikuoti. Visos konstrukcijos buvo sukurti molekulinio klonavimo būdu. Transgenai buvo integruoti į žuvies genomą Tol2 transpozono sistemos pagalba (Balciunas et al. 2006). Sukurtos plazmidės (8.4 ng/ μ l) buvo mikroinjekuotos su Tol2 transpozazės mRNR (40 ng/ μ l) į apvaisintus laukinio tipo žuvies ikrus vienos ląstelės stadijoje.

Trečią dpf embrionai buvo atrenkami naudojant NIKON SMZ1500 ir ZEISS Axio IMAGER.A1 fluorescentinius mikroskopus. Embrionai, pasižymintys stipria raudonojo fluorescentinio baltymo (mRFP) raiška, buvo atrenkami tolimesniam auginimui. Maždaug trijų mėnesių amžiaus F0 mozaikinės žuvys buvo kryžminamos tarpusavyje arba su laukinio tipo žuvimis. Trys F1 šeimos, atitinkančios bent tris nepriklausomus transgeno integracijos įvykius, buvo atrenkamos iš kiekvieno kamieno ir paliekamos tolimesniam auginimui. Iš viso buvo užaugintos 48 šeimos. F1 transgeniniai individai iš kiekvienos šeimos buvo kryžminami su laukinio tipo individais. Trečią dpf F2 embrionai buvo atrenkami pagal fluorescenciją ir fotografuojami.

1. 4. *tbx5a*^{tp158} mutacijos reversija *in vivo* naudojant Flp^o rekombinazę

Norint patikrinti ar S1 geno gaudyklėje esanti mutageninė kasetė gali būti apversta *tbx5a*^{tp158} kamiene naudojant Flp^o rekombinazę, *tbx5a*^{tp158} heterozigotos buvo sukryžmintos su *UAS:mRFP* individais panaudojus *in vitro* apvaisinimą. Apvaisinti ikrai vienos ląstelės stadijoje buvo mikroinjekuoti su Flp^o mRNR (75 pg). F0 embrionai, pasižymintys mozaikine mRFP raiška ir švelnesniu krūtininių pelekų fenotipu, buvo atrinkti ir užauginti. Trijų mėnesių F0 žuvis buvo sukryžmintos su *UAS:mRFP* individais. mRFP-teigiami ir mRFP-neigiami embrionai buvo suskirstyti į atskiras grupes ir suskaičiuoti. Dėtis, pasižyminti žemiausiu mRFP-teigiamų embrionų procentu, buvo užšaldyta DNR išskyrimui - 80°C temperatūroje.

DNR embrionų genotipavimui buvo izoliuota iš atskirų individų naudojant standartinį protokolą (Balciuniene et al. 2013). Ta pati žuvų pora buvo pakartotinai sukryžmintas, o gauti embrionai užauginti. Suaugėlių genotipavimui žuvis buvo anestezuojamos inkubuojant jas 3 minutes 0.446 mM MS222 tirpale. Distalinė uodeginio peleko dalis (maždaug 20% viso uodeginio peleko) buvo amputuota su mažomis žirkutėmis ir užšaldyta -80°C temperatūroje. Genominė DNR buvo išskirta naudojant standartinį protokolą.

DNR, kuri buvo išskirta iš viso embriono kūno arba dalinai amputuoto suaugėlio uodeginio peleko, buvo praskiedžiama iki 100 ng/μl. Vienas μl praskiestos DNR buvo naudojamas kaip matrica polimerazės grandininėje reakcijoje (PGR). Trijų pradmenų PGR buvo atlikta panaudojus du genominius pradmenis (*tbx5a*-F1 5'-ATCCCCGTCATCGCAGACTACATACATT-3', *tbx5a*-R1 5'-TTATCAAGTTTAGCTTACCTCTGGACAG-3') ir vieną mutageninės kasetės zpA specifinį pradmenį (zpA-F2 5'-CATATGAAGGTAGCTAACTG CAA-3'). PGR produktai buvo atskirti atlikus 1% agarozės gelio elektroforezę. DNR juostų dydžiui nustatyti buvo panaudotas GeneRuler™ DNR fragmentų dydžio standartas. PGR produkto juostos, kurių dydis maždaug atitiko 671 bp,

buvo išskirtos iš gelio ir nusiųstos sekoskaitai (Genewiz®). Gautos sekos buvo išanalizuotos naudojant A Plasmid Editor (ApE) programą.

1. 5. Sąlyginė *tbx5a^{tp158R}* lokuso re-mutacija *in vivo* naudojant Cre rekombinazę

Norint nustatyti ar S1 geno gaudyklėje esanti mutageninė kasetė gali būti apversta *tbx5a^{tp158R}* kamiene panaudojus Cre rekombinazę, vienos ląstelės stadijos embrionai, gauti sukryžminus *tbx5a^{tp158R}* heterozigotas su *UAS:mRFP* kamienu, buvo mikroinjekuoti su *Cre* mRNR (25 pg). Trijų dpf lervos, turinčios mRFP-teigiamas širdis, buvo atrinktos naudojant fluorescencinę mikroskopą ir nupaveiksluotos.

Sąlyginei sistemai sukurti, pilnai revertuotas *tbx5a^{tp158R}* kamienas buvo sukryžmintas su *tnnt2a:CreER^{T2}* transgeninėmis žuvimis. Embrionai su mRFP ir GFP-teigiamomis akimis buvo atrinkti ir užauginti. Dviejų mėnesių amžiaus žuvis buvo genotipuotos. Genotipuoti *tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a: CreER^{T2}* transgeniniai individai buvo sukryžminti su *tnnt2a:CreER^{T2}* žuvimis. Embrionai, turintys mRFP/ GFP akis, buvo užauginti ir genotipuoti.

Įsteigti transgeniniai kamienai, *tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}* ir *tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}*, buvo panaudoti sąlyginės mutacijos indukcijai *tbx5a* gene. Norint patikrinti, ar *tbx5a^{tp158R}* lokusas gali būti sąlyginai re-mutuotas besivystančioje širdyje, *tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* žuvis buvo sukryžmintos su laukinio tipo individais. Gauti palikuonys antrą dpf buvo įdėti į 0.5 μM 4-hidroksitamoksifeno (4-HT) tirpalą ir palikti 24 valandoms tamsoje. Keturių dpf lervos buvo atrinktos pagal mRFP raišką širdyje ir paliktos auginti. Praėjus trims mėnesiams, trys tos pačios dėties individai buvo eutanizuoti. Išskrostos širdys buvo apžiūrėtos po fluorescenciniu mikroskopu, nupaveiksluotos ir užfiksuotos 4 % paraformaldehido (PFA) tirpale.

Norint patikrinti ar *tbx5a^{tp158R}* lokusas gali būti sąlyginai re-mutuotas suaugusioje širdyje, *tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}* ir *tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* suaugėliai buvo laikomi 5 μM 4-HT tirpale. Iš viso, žuvis buvo inkubuotos tris kartus po 24 valandas su vienos paros pertrauka tarp inkubacijų. Kontrolinė *tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* grupė buvo laikoma etanolio tirpale. Praėjus vienai savaitei po eksperimento, trys žuvis iš eksperimentinės grupės ir trys iš kontrolinės grupės buvo eutanizuotos. Išskrostos širdys buvo apžiūrėtos po fluorescentiniu mikroskopu, nupaveiksluotos ir užfiksuotos 4 % PFA. Likusios žuvis iš tų pačių dėčių buvo panaudotos širdies regeneracijos tyrimams.

1. 6. Širdies regeneracijos tyrimai: dalinė skilvelio amputacija, skrodimai, histologinių preparatų ruošimas ir dažymas

Širdies regeneracijos eksperimentams buvo naudoti keturi kamienai: *tbx5a* insercinis mutantas (*tbx5a^{tp158/+}*), *tbx5a* sąlyginiai mutantai (*tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}* ir *tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}*) ir publikuotas *tbx5a* ENU mutantas, *heartstrings* (*tbx5a^{hst/+}*) (Garrity et al., 2002). Žuvų amžius svyravo nuo trijų iki šešių mėnesių. Širdies raumens pažeidimams sukelti buvo panaudotas dalinės širdies skilvelio amputacijos protokolas (Poss et al., 2002).

Visos žuvis buvo eutanizuotos inkubuojant 15 minučių 0.892 mM MS222 tirpale 30 dienų po amputacijos. Adatėlėmis pritvirtinus negyvą žuvį prie kempinės, įdėtos į mažą Petri lėkštutę, širdys buvo kruopščiai išskrodžiamos mikrožirklučių ir smulkaus pinceto pagalba ir įdedamos į mažą Petri lėkštutę pripildytą 1x izotoniniu buferiniu fosfato fiziologiniu druskos tirpalu (PBS). Išskrostos širdys buvo išvalomos nuo riebalų ir likusių audinių (pavyzdžiui, perikardiumo) su pincetu.

Fluorescentinės (mRFP) ir šviesinės nuotraukos buvo padaromos naudojant NIKON mikroskopo 10x, 25x, ir 40x padidinimus. Širdys buvo fiksuojamos 24 valandas 4 % PFA +4°C temperatūroje. Kitas dvi dienas širdys buvo valomos 1x

PBS tirpale (pakeičiamas 4 - 5 kartus per dieną) +4°C temperatūroje. Išvalytos širdys buvo dehidratuojamos 1x PBS ir etanolio (EtOH) tirpaluose (2 kartus po 10 minučių kiekviename tirpale): 100 % PBS, 25 % EtOH/ 75 % PBS, 50 % EtOH/ 50 % PBS, 75 % EtOH/ 25 % PBS, 100 % EtOH.

Dehidratuotos širdys buvo įdedamos į ksilenus ir po 30 minučių perkeliama į formas, pripildytas išlydyto parafino. Su pincetu ir adata širdys buvo užfiksuojamos tokioje padėtyje, kad širdies išilginė ašis išliktų lygiagrečiai formos pagrindo atžvilgiu. Formos su parafinu ir širdimis buvo dedamos į + 56 °C vandens vonią. Praėjus 30 minučių, formos buvo išimamos iš vandens vonios ir paliekamos nakčiai kambario temperatūroje. Kitą dieną parafino kubeliai su širdimis buvo išimami iš formų ir pritvirtinami prie medinių kubelių.

Aštuonių nanometrų storio širdžių pjūviai buvo padaromi naudojant Leica mikrotomą. Parafino juostelė su 3 - 4 širdies pjūviais buvo uždedama ant distiliuoto vandens paviršiaus, priešildyto iki + 42 °C. Su smulkiu pincetu ir mažu teptuku parafino juostelė buvo atsargiai perkeliama nuo vandens paviršiaus ant objektyvio stiklelio. Preparatai buvo padedami ant + 42 °C priešildytos plokštės, kur buvo laikomi kol visas vanduo išgaruos nuo stiklelio paviršiaus. Preparatai buvo paliekami nakčiai kambario temperatūroje. Kitą dieną širdies pjūviai buvo įdedami į ksilenus. Po 24 valandų pjūviai buvo rehidratuojami 1x PBS ir etanolio tirpaluose (2 kartus po 15 minučių kiekviename tirpale): 100 % EtOH, 75 % EtOH/ 25 % PBS, 50 % EtOH/ 50 % PBS, 25 % EtOH/ 75 % PBS, 100 % PBS.

Miokardiumo rando vizualizacijai, rehidratuoti širdies histologiniai pjūviai buvo padažomi naudojant Picro-Mallory procedūrą (González-Rosa et al., 2011). Širdies raumuo buvo dažomas raudonai, o kolageno skaidulos, kurios sudaro randą, buvo dažomos mėlynai. Iš karto po dažymo pjūviai buvo greitai dehidratuojami: po 1 minutę 95% ir 100% etanolyje, 2 - 3 sekundes ksilenuose. Dehidratuoti širdies pjūviai buvo uždengiami dengiamaisiais stikliukais. Preparatai buvo paliekami išdžiūti nakčiai traukos spintoje kambario temperatūroje.

Ląstelių branduoliai buvo dažomi 10 minučių inkubuojant širdies pjūvius DAPI dažų tirpale. Padažyti pjūviai buvo skalaujami 1x PBS tirpale. Preparatai buvo uždengiami ir paliekami išdžiūti nakčiai traukos spintoje kambario temperatūroje. Pjūviai buvo analizuojami naudojant ZEISS Axio IMAGER.A1 mikroskopą. Taip pat buvo padaromos preparatų šviesinės ir/ arba fluorescentinės nuotraukos.

1. 7. Statistinė analizė

Gautų duomenų grupavimas ir statistinė analizė buvo atlikti su STATISTICA 13 programos pagalba. “Exact binomial test of goodness-of-fit” buvo panaudotas nulinės hipotezės tikrinti. Nulinėje hipotezėje buvo teigiama, kad sukryžminus *tbx5a^{tp158/+}* heterozigotą su *UAS:mRFP* homozigota, gautų mRFP-neigiamų embrionų, pasižyminčių krūtininiais pelekais be vystymosi defektų, skaičius ($n_1 = 241$) nesiskiria nuo mRFP-teigiamų embrionų, pasižyminčių krūtininiais pelekais su vystymosi defektais, skaičiaus ($n_2 = 290$). “Exact binomial test of goodness-of-fit” buvo pasirinktas nulinei hipotezei tikrinti, nes analizuojamos imties dydis buvo mažas ($n < 1000$) ir analizei buvo naudojamas tik vienas nominalusis (kategorinis) kintamasis (krūtininių pelekų morfologija).

Norint išsiaiškinti, ar nulinė hipotezė, kurioje buvo teigiama, kad širdies regeneracijos defektai atsiranda nepriklausomai nuo 4-HT pagalba indukuojamos *tbx5a^{tp158}* mutacijos, yra teisinga, buvo panaudotas “Fisher exact test of independence.” Būtent šis testas buvo pasirinktas nulinei hipotezei tikrinti, nes analizuojama imtis pasižymėjo mažu dydžiu ($n = 15$) ir analizei buvo naudojami du nominalieji (kategoriniai) kintamieji (tirpalo rūšis: etanolio tirpalas arba 5 μ M 4-HT tirpalas; širdies regeneracijos defektas: randas yra arba rando nėra) (lentelė 1).

Lentelė 1. Rezultatai, gauti tyrinėjant širdies regeneraciją *tnnt2a:CreER^{T2}*, *tbx5a^{tp158R/tp158R}* suaugusiose žuvyse, buvo įvertinti naudojant statistinę analizę (“Fisher exact test of independence”). Kontrolinė grupė (n = 8) buvo laikoma etanolio tirpale, todėl *tbx5a^{tp158}* mutacija buvo išjungta. Eksperimentinė grupė (n = 7) buvo inkubuojama 5μM 4-HT tirpale, kuris indukuoja *tbx5a^{tp158}* mutaciją kardiomiocituose, kai CreER^{T2} raiška yra aktyvinama su *tnnt2a* promotoriumi. Taigi bent kai kuriose širdies raumens ląstelėse *tbx5a^{tp158}* mutacija yra įjungta.

Tirpalas	Širdis 30 dpa		Iš viso
	Neregeneravusi (Randas yra)	Regeneravusi (Rando nėra)	
EtOH -> <i>tbx5a^{tp158}</i> išjungta	0	8	8
4-HT -> <i>tbx5a^{tp158}</i> įjungta	7	0	7
Iš viso	7	8	15

2. Svarbiausi rezultatai ir jų aptarimas

2.1. Inscerinių mutantų identifikacija

Šeši iš aštuonių potencialių mutantinių kamienų, sukurtų Dr. Balčiūno laboratorijoje, buvo sėkmingai charakterizuoti su aPGR ir 5'RACE pagalba (lentelė 2). Abu metodai remiasi tuo, kad mutageno, tai yra, genų gaudyklės, seka yra žinoma. aPGR strategija leidžia tiksliai nustatyti transpozono integraciją, o 5'RACE metodas tik suteikia informaciją apie 5' egzonus, esančius prieš genų gaudyklės integraciją. Taigi genotipavimui skirtų pradmenų kūrimas gali būti problematiškas ir nevisada efektyvus. Dėl šios priežasties mutantų genotipavimas su PGR pagalba kartais būna neįmanomas.

Trys iš aštuonių mutacijų (B4-12-2, B1-40A, B4-23-1) buvo identifikuotos su aPGR metodu. B4-12-2-1 kamienas pasižymėjo fluorescentinio baltymo raiška nervų sistemoje. Nustatyta, kad genų gaudyklė yra potencialaus geno *ENSDART00000112671* antrajame introne. B1-40-A lervoms buvo būdinga

fluorescentinio baltymo raiška kraujyje. Transpozono integracija buvo aptikta potencialaus geno, *ENSDART00000111400*, pirmajame introne. B4-23-1 kamienas turėjo fluorescentinio baltymo raišką kraujagyslėse. Genų gaudyklės integracija buvo identifikuota *fli1b* (*friend of leukemia integration 1b*) geno pirmajame introne. Charakterizuotas *fli1b^{tp158}* insercinis kamienas buvo vėliau panaudotas kraujagyslių sistemos vystymosi (Craig et al. 2015) ir regeneracijos tyrimuose.

Lentelė 2. Insecinių kamienų identifikacijos rezultatų apibendrinimas.

Kamienas	Raiška	Identifikacijos metodas	Integracijos vieta	
			Mutuoto geno pavadinimas	Intronas
B4-12-1	Visur	5'RACE	Neidentifikuotas	Neidentifikuotas
B4-12-2	Nervų sistema (floor plate)	iPCR	<i>ENSDART</i> <i>00000112671</i>	2
B1-31A	Kraujagyslės	5'RACE	<i>ENSDART</i> <i>00000114996</i>	1
B1-40A	Kraujas	iPCR	<i>ENSDART</i> <i>00000111400</i>	1
B1-42-1A	Širdis ir somitai	5'RACE	<i>pdlim7</i>	3
B1-45A	Galvos smegenys	5'RACE	<i>smndc1</i>	1
B4-23-1	Kraujagyslės	iPCR	<i>fli1b</i>	1
B4-24-1	Nervinė ketera	5'RACE	Neidentifikuotas	Neidentifikuotas

Trys mutantiniai kamienai (B1-31A, B1-42-1A, B1-45A) buvo identifikuoti panaudojus 5'RACE metodą. B1-31-A insercinis mutantas turėjo fluorescentinio baltymo raišką kraujagyslėse. Nustatyta, kad genų gaudyklės integracijos vieta yra potencialaus geno, *ENSDART00000114996*, pirmajame introne. B1-42-1A embrionai pasižymėjo fluorescentinio baltymo teigiama širdimi ir somitais, o transpozono integracija buvo lokalizuota *pdlim7* (*PDZ and LIM domain 7*) geno trečiajame introne.

Camarata ir kiti (2010) parodė, kad *pdlim7* ir *tbx5a* genų raiškos lokalizacija sutampa širdies ir krūtininių pelekų vystymosi metu. Be to, žinoma, jog *Pdlim7* baltymas reguliuoja *Tbx5a* lokalizaciją ir transkripcijos aktyvumą kardiogenezės metu (Camarata et al. 2010). B1-45A kamienui buvo būdinga fluorescentinio baltymo raiška galvos smegenyse. Genų gaudyklės integracija buvo identifikuota *smndc1* (*survival motor neuron domain containing 1*) geno pirmajame introne.

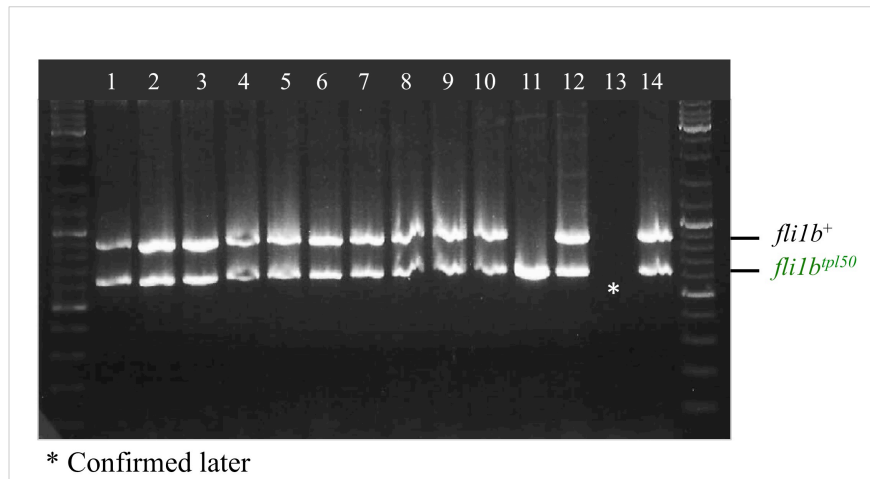
2. 2. Kraujagyslių regeneracija *fli1b^{tp150}* inserciniuose mutantuose

Norint išsiaiškinti, ar *fli1b* genas yra svarbus kraujagyslių regeneracijai, buvo atliktas aklas eksperimentas. Keturiolikai suaugusių žuvų, gautų sukryžminus *fli1b^{tp150/+}* heterozigotas, buvo dalinai nukirpti uodeginiai pelekai. Regeneracijos proceso stebėjimai ir dokumentavimas buvo atlikti keturių skirtingų stadijų metu.

Baigus regeneracijos eksperimentą, anksčiau amputuoti ir užšaldyti audiniai buvo sėkmingai panaudoti DNA išskirti. Genotipavimo rezultatai parodė, kad tik viena iš keturiolikos žuvų buvo homozigotinė *fli1b^{tp150}* alelio atžvilgiu (2 pav.). Gauti duomenys leidžia manyti, kad *fli1b^{tp150/tp150}* žuvims yra būdingas žemesnis išgyvenamumo lygis negu *fli1b^{tp150/+}* individams.

Fluorescentinio baltymo raiškos tyrimai *fli1b^{tp150}* inserciniame kamiene parodė, kad 7 dpa žalio fluorescentinio baltymo raiškos lygis kraujagyslėse yra

žymiai padidėjęs (3 pav.). Toks GFP raiškos pokytis buvo pastebėtas heterozigotose ir homozigotoje. *fli1b^{tp150/tp150}* žuvis mirė po anestezijos 7 dpa. Stebėjimai atskleidė, kad GFP raiška *fli1b^{tp150/+}* individuose palaipsniui mažėjo. Žymi fluorescencijos redukcija buvo stebima 14 dpa, o 21 dpa GFP raiškos lygis buvo beveik toks pat kaip prieš uodeginio peleko amputaciją (3 pav).

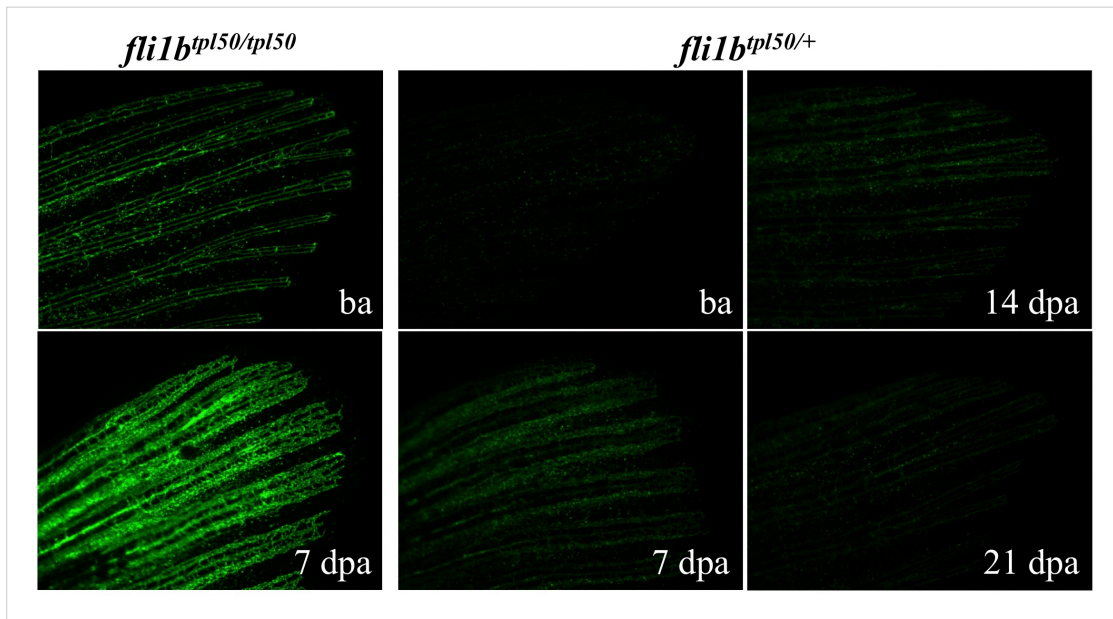


2 paveikslas. *fli1b* lokuso genotipavimo rezultatai. Kiekviename takelyje esantis PGR produktas buvo amplifikuotas naudojant atskirų suaugusių žuvų DNR. Šios žuvis buvo gautos sukryžminus du *fli1b^{tp150/+}* individus.

Fluorescentinio baltymo raiškos tyrimai *fli1b^{tp150}* inserciniame kamiene parodė, kad 7 dpa žalio fluorescentinio baltymo raiškos lygis kraujagyslėse yra žymiai padidėjęs (3 pav.). Toks GFP raiškos pokytis buvo pastebėtas heterozigotose ir homozigotoje. *fli1b^{tp150/tp150}* žuvis mirė po anestezijos 7 dpa. Stebėjimai atskleidė, kad GFP raiška *fli1b^{tp150/+}* individuose palaipsniui mažėjo. Žymi fluorescencijos redukcija buvo stebima 14 dpa, o 21 dpa GFP raiškos lygis buvo beveik toks pat kaip prieš uodeginio peleko amputaciją (3 pav).

GFP raiškos analizė parodė, jog 7 dpa *fli1b^{tp150}* suaugėlių regeneruojantis uodeginis pelekas pasižymi dideliu GFP-teigiamų kraujo ląstelių skaičiumi. Aptiktos ląstelės buvo bent dviejų rūšių. Vienos GFP-teigiamos ląstelės buvo

mažos ir greitai judančios, o kitos - didelės ir lėtai judančios. GFP-pozytivių ląstelių skaičius žymiai sumažėjo 14 dpa, o 21 dpa jos beveik visai išnyko. Prieš amputaciją mažos GFP-teigiamos kraujo ląstelės buvo matomos labai retai, o didelės visai nebuvo aptiktos. Mažos GFP-teigiamos ląstelės, stebimos kraujotakoje uodegos regeneracijos metu, potencialiai galėtų būti endotelinėmis ląstelėmis. Tuo tarpu stambios GFP-teigiamos ląstelės tikriausiai galėtų būti makrofagais. Cirkuliuojančios *fli1b*^{tp150}- teigiamos ląstelės galėtų atsirasti arba iš žaizdos blastemos arba iš kitur kaip atsakas pažeidimui.



3 paveikslas. GFP raiškos pokyčiai *fli1b*^{tp150/tp150} ir *fli1b*^{tp150/+} suaugėlių regeneruojančios uodegos kraujagyslėse. Kiekvienoje nuotraukoje yra parodytas distalinės uodeginio peleko dalies viršutinis galas.

Nors *fli1b* raiškos lygis žymiai pasikeičia uodeginio peleko regeneracijos metu, buvo nustatyta, kad *fli1b*^{tp150/+} suaugusios žuvys sugeba regeneruoti kraujagysles. Jau 21 dpa *fli1b*^{tp150/+} uodegos atrodo visiškai ataugusios, bet vis dar turi mažiau pigmentacijos negu prieš amputaciją. Įmanoma, kad regeneracija vyksta normaliai, nes *fli1a* geno produktas kompensuoja Fli1b baltymo lygio

redukcija. Pakartotiniai bandymai parodė, kad *fli1b^{tp150/tp150}* žuvų uodeginis pelekas regeneruoja šiek tiek nevienodai (duomenys nerodomi). Viršutinė uodegos dalis atauginėjo kiek greičiau nei apatinė. Tačiau, 21 dpa uodeginiai pelekai atrodė visiškai normalūs.

2. 3. *tbx5a^{tp158}* lervų ir suaugėlių morfologinė/ anatominė bei genotipinė analizė

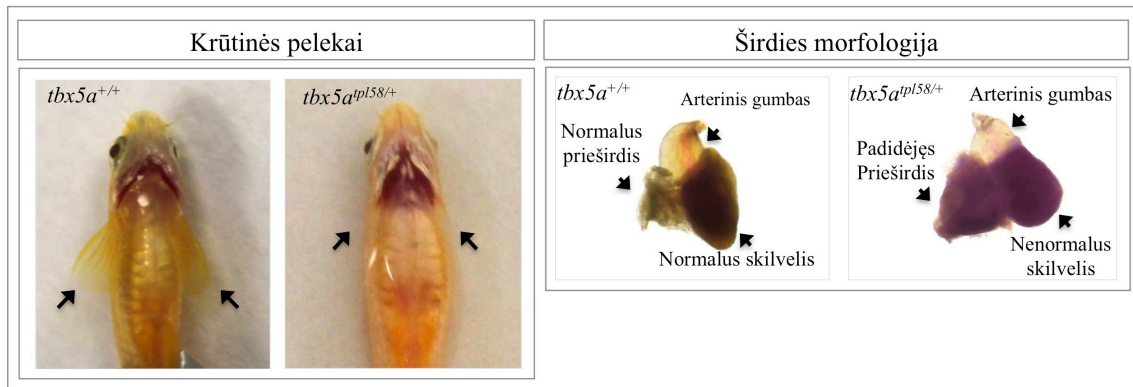
Norint aprašyti *tbx5a^{tp158}* kamieno heterozigotinį fenotipą, *tbx5a^{tp158}* heterozigotos buvo sukryžmintos su *UAS:mRFP* žuvimis. Išsami šešių dpf lervų morfologinė analizė parodė, kad *tp158* mutacija, kuri yra *tbx5a* geno antrajame introne, sukelia haplonepakankamumą *D. rerio* modelinėje sistemoje.

Palyginus su laukinio tipo tos paties dėties lervomis (n = 290), visos išanalizuotos šešių dpf *tbx5a^{tp158/+}* heterozigotos (n = 241) pasižymėjo akivaizdžia krūtininių pelekų redukcija (4 pav.). Taigi nustatytas *tbx5a* dozei jautrus fenotipas yra visiškai penetruojantis. Aptiktas krūtininių pelekų fenotipas sutampa su defektais, kurie buvo anksčiau aprašyti *D. rerio* embrionuose, injektuotuose su *tbx5a* morfolinu (Ahn et al., 2002). Be to, panašus *tbx5* haplonepakankamumo sukeltas neigiamas poveikis priekinių galūnių vystymuisi yra taip pat žinomas iš *Tbx5* heterozigotinių pelių tyrimų (Bruneau et al., 2001) ir klinikinių duomenų, gautų analizuojant pacientus su Holt-Oramo sindromu, kurie neturi vienos veikiančios *TBX5* kopijos (Basson et al., 1999).

Nustatyta, kad dauguma (60 %) visų ištirtų *tbx5a^{tp158/+}* lervų pasižymėjo vienodai pakitusiais krūtininiais pelekais. Viena trečioji *tbx5a^{tp158/+}* (29 %) turėjo trumpesnę kairįjį krūtininį peleką. Likusieji 11 % heterozigotų pasižymėjo sutrumpėjusiu dešiniuoju krūtininiu peleku. Skirtingai paveiktų krūtininių pelekų sutinkamumas *tbx5a^{tp158/+}* embrionuose atitinka skirtingai paveiktų priekinių galūnių sutinkamumą, kuris buvo aprašytas pacientuose su Holt-Oramo sindromu (Poznanski et al., 1970; Newbury-Ecob et al., 1996). Šie atradimai leidžia manyti,

kad *tbx5a* genas turi panašią reikšmę žuvies ir žmogaus priekinių galūnių vystymuisi.

Su statistinės analizės (“The exact binomial test of goodness-of-fit”) pagalba buvo patikrinta nulinė hipotezė, kuri teigia, kad sukryžminus *tbx5a^{tp158/+}* heterozigotą su *UAS:mRFP* homozigota, gautų mRFP-neigiamų embrionų (pasižyminčių krūtininiais pelekais be vystymosi defektų) skaičius ($n_1 = 241$) nesiskiria nuo mRFP-teigiamų embrionų (pasižyminčių krūtininiais pelekais su vystymosi defektais) skaičiaus ($n_2 = 290$). Atlikta analizė parodė, kad nulinė hipotezė gali būti atmesta, nes vystymosi sutrikimus turinčių lervų skaičius (*tbx5a^{tp158/+}*) patikimai skiriasi nuo laukinio tipo lervų skaičiaus (*tbx5a^{+/+}*) ($p = 0.037$). Taigi maždaug 17 % *tbx5a^{tp158/+}* embrionų miršta iki trijų dpf. Pastebėta, kad tik 3 - 5% *tbx5a^{tp158/+}* išgyvena iki brandos.

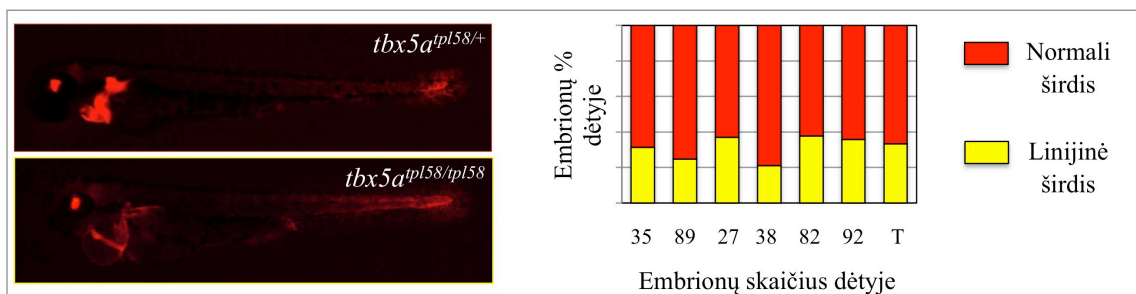


4 paveikslas. Krūtininių pelekų ir širdies defektai *tbx5a^{tp158/+}* suaugėliuose.

Visi išanalizuoti *tbx5a^{tp158/+}* suaugėliai ($n = 48$) neturėjo krūtininių pelekų (4 pav.). Be to, visos širdys, išskrostos iš *tbx5a^{tp158/+}* ($n = 13$), pasižymėjo akivaizdžiu defektu: turėjo padidėjusį prieširdį ir deformuotą skilvelį. Vystymosi defektai, kurie buvo aptikti *tbx5a^{tp158/+}* žuvyse, yra panašūs į širdies ydas, charakterizuotas pelių *Tbx5* heterozigotose (Bruneau et al., 2001). Toks fenotipinis panašumas leidžia daryti prielaidą, kad *tbx5* genas atlieka panašų vaidmenį įvairių stuburinių gyvūnų širdies vystymosi procese.

Norint aprašyti homozigotinį fenotipą $tbx5a^{tp158}$ inserciniame kamiene, $tbx5a^{tp158/+}$ buvo sukryžmintos tarpusavyje naudojant *in vitro* apvaisinimo metodą. Tik mRFP-teigiami embrionai buvo analizuojami. Iš viso, buvo išnagrinėtos 363 lervos iš 6 dėčių. Dėtis, kurią sudarė 27 embrionai, buvo panaudota atskirų embrionų genotipavimui. Nustatyta, kad $tp158$ mutacija sukelia letalų homozigotinį fenotipą. Visos $tbx5a^{tp158/tp158}$ lervos turėjo linijinę širdį ir visiškai redukuotus krūtininius pelekus (5 pav.).

Širdies ir krūtininių pelekų defektai, kurie buvo nustatyti $tbx5a^{tp158/tp158}$, yra labai panašūs į anksčiau aprašytus *D. rerio* fenotipus: embrionuose, kurie buvo injekuoti su $tbx5a$ morfolinu (Ahn et al., 2002), ir $tbx5a$ ENU *heartstrings* ($tbx5a^{hst}$) mutantuose (Garrity et al., 2002). Iš kitos pusės, besivystančios širdies defektai aptikti *hst* homozigotose varijavo nuo švelnių (edema ir ne visai suformuota širdis) iki sunkių (edema ir linijinė širdis). Tuo tarpu visos $tbx5a^{tp158/tp158}$ pasižymėjo esminėmis širdies struktūrų deformacijomis (edema ir linijine širdimi). Kadangi $tbx5a^{hst}$ mutantų sutrumpintame Tbx5a baltyme išlieka T-box DNR prisijungimo domenas, galbūt baltymas vis dar pasižymi aktyvumu. Tuo tarpu, kadangi Tbx5a-Gal4 sulietas baltymas $tbx5a^{tp158}$ mutantuose yra visiškai praradęs T-box prisijungimo domeną, sulietas baltymas galėjo visiškai prarasti savo pirminę funkciją. Taigi remiantis gautais morfologiniais/anatominiais ir genotipavimo duomenimis, $tbx5a^{tp158}$ yra nulinis $tbx5a$ alelis.



5 paveikslas. $tbx5a^{tp158}$ mutacija sukelia letalų homozigotinį širdies fenotipą.

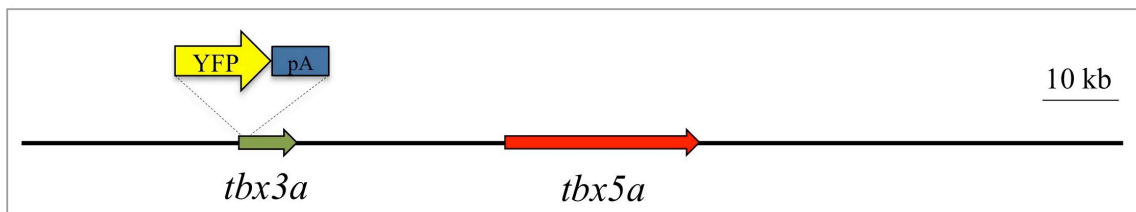
2. 4. Morfologinių/ anatominių defektų “kompensavimas” $tbx5a^{tp158}$ ir $tbx5a^{hst}$ mutantuose naudojant bakterijų dirbtinę chromosomą su $tbx5a$ genu

Norint patikrinti ar $tbx5a$ mutacijų defektai gali būti kompensuojami su bakterijų dirbtine chromosoma, kurioje yra įdėtas žuvies $tbx5a$ genas, $BAC(tb3a:YFP;tbx5a)$ kamienas buvo sukryžmintas su $tbx5a^{tp158/+}$ ir $tbx5a^{hst/+}$ žuvimis. $BAC(tb3a:YFP; tbx5a)$ kamiene integruota bakterijų dirbtinė chromosoma turi *D. rerio* genomines DNR regioną, apimančią 144155 bp penktos chromosomos fragmentą su dviem pilnais *genais*, $tbx3a$ ir $tbx5a$ (6 pav.). $BAC(tb3a:YFP;tbx5a)$ kamiene esančio $tbx3a$ geno pirmajame egzone (471 bp už ATG) yra įdėta Venus geltonojo fluorescentinio baltymo (YFP) seka ir po jos sekanti SV40 transkripcijos terminacijos poliadenilino seka, pA (6 pav.). Taigi $tbx3a$ kopija, esanti bakterijų dirbtinėje chromosomoje, yra mutuota. Tokiu būdu yra išvengiama per aukštos $tbx3a$ raiškos. Kadangi YFP atkartoja $tbx3a$ raišką, fluorescentinio baltymo raiška dviejų dpf embrionuose buvo naudojama kaip atrankos žymuo, nurodantis sėkmingą $BAC(tb3a:YFP;tbx5a)$ integraciją genome.

Kadangi hst mutacija yra recesyvinė (Garrity et al., 2002), sukryžminus $tbx5a^{hst/+}$ individus tarpusavyje, buvo tikimasi pamatyti 25 % palikuonių turinčių mutantinį fenotipą: linijinę arba ne visiškai susiformavusią širdį ir visiškai redukuotus krūtininius pelekus. Tačiau, kai $tbx5a^{hst/+}$ žuvis buvo sukryžmintas su $tbx5a^{hst/+};BAC(tb3a:YFP;tbx5a)$ individais, nustatyta, kad tik 10 % palikuonių ($n = 15/145$) pasižymėjo numatytu homozigotiniu fenotipu. Tuo tarpu 12 % ($n = 17$) embrionų turėjo redukuotus krūtininius pelekus ir normalią širdį. Likusioji dėtis dalis, kurią sudarė 78 % visų lervų ($n = 113$), kaip ir tikėtasi, neturėjo jokių pastebimų vystymosi defektų.

Kadangi dalinė krūtininių pelekų redukcija nėra aptinkama hst heterozigotose ir homozigotose, fenotipas, kuris buvo aptiktas 12 % ($n = 17$) visų embrionų, galėtų būti dalinio hst mutacijos “kompensavimo” rezultatas. Atlikta penkių lervų genotipavimo analizė parodė, kad visi ištirti embrionai buvo hst

homozigotos. Gauti duomenys atskleidė, kad papildoma *tbx5a* kopija, suteikta su *BAC(tbx3a:YFP;tbx5a)* bakterijų dirbtinės chromosomos pagalba, buvo sėkmingai panaudota *heartstrings* mutacijos sukeltų morfologinių/ anatominių defektų “kompensavimui” žuvies embrionuose. Pastebėtina, kad vienas iš 12 *tbx5a^{hst/hst}*; *tbx5aBAC(tbx3a:YFP;tbx5a)* individų išgyveno iki brandos. Suaugusi žuvis visiškai neturėjo krūtininių pelekų ir išgyveno iki 6 mėnesių. Taigi *BAC(tbx3a:YFP;tbx5a)* alelis “kompensavo” letalų fenotipą *hst* mutantuose ir vienas homozigotinis embrionas išgyveno iki brandos.



6 paveikslas. *D. rerio* genomis regionas, esantis *BAC(tbx3a:YFP;tbx5a)* bakterijų dirbtinėje chromosomoje.

Norint patikrinti, ar ta pati *BAC* kopija gali “kompensuoti” vystymosi defektus inserciniuose *tbx5a^{tp158}* mutantuose, tas pats *tbx5a^{hst/+};BAC(tbx3a:YFP;tbx5a)* patinas buvo sukryžmintas su *tbx5a^{tp158/+}* patele panaudojus *in vitro* apvaisinimo metodą. Iš ankstesnių pastebėjimų buvo žinoma, kad kai *tbx5a^{hst/+}* žuvis yra kryžminamos su *tbx5a^{tp158/+}* individais, 25 % gautų palikuonių turi visiškai linijinę širdį ir neturi krūtininių pelekų. Kitaip tariant, *tbx5a^{hst/tp158}* embrionai pasižymi homozigotiniu fenotipu, kuris yra būdingas *tbx5a^{hst/hst}* bei *tbx5a^{tp158/tp158}* individams.

Nustatyta, kad 3 % visų lervų ($n = 91$), kurios buvo gautos sukryžminus *tbx5a^{hst/hst};BAC(tbx3a:YFP;tbx5a)* žuvis su *tbx5a^{tp158/+}* kamienu, turėjo dalinai “kompensuotą” širdies defektą, bet visai neturėjo krūtininių pelekų. Tačiau nei vienas embrionas neišgyveno iki brandos. Gauti rezultatai parodė, kad papildoma *tbx5a* kopija, suteikta su *BAC(tbx3a:YFP;tbx5a)* bakterijų dirbtine chromosoma,

buvo sėkmingai panaudota insercinės *tbx5a^{tp158}* mutacijos sukeltų morfologinių/ anatominių defektų daliniam “kompensavimui” žuvies embrionuose.

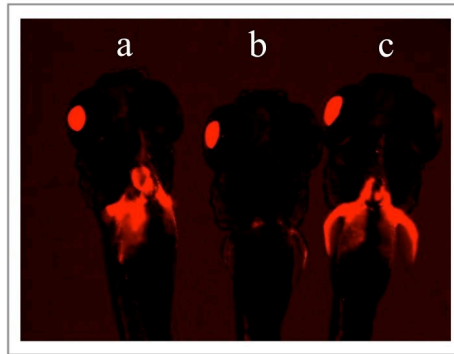
Kadangi *BAC(tbx3a:YFP;tbx5a)* bakterijų dirbtinės chromosomos sudėtyje yra du genai, *tbx3a* ir *tbx5a*, nėra aišku ar nustatytas *tbx5a^{tp158}* ir *tbx5a^{hst}* mutacijų sukeltų morfologinių/ anatominių defektų “kompensavimas” buvo sąlygotas vieno atskiro geno ir abiejų genų cis-reguliacinių elementų. Buvo pastebėta, kad visų stuburinių genomuose *tbx3* ir *tbx5* visada yra greta vienas kito (Horton et al., 2008). Taip pat publikuoti duomenys rodo, kad abiejų genų raiškos pasiskirstymas yra dalinai panašus; *tbx3* ir *tbx5* genų raiška buvo aptikta besivystančioje širdyje ir priekinėse galūnėse (Gibson-Brown et al., 1998; Yonei-Tamura et al., 1999; Wang et al., 2014). Tai leidžia daryti prielaidą, jog *tbx3* ir *tbx5* gali turėti bendrus cis-reguliacinius elementus, kurie yra būtini normaliam širdies ir priekinių galūnių vystymuisi, ir galėtų būti atsakingi už *tbx5a^{tp158}* ir *tbx5a^{hst}* mutacijų sukeltų morfologinių/ anatominių defektų “kompensavimą.”

2. 5. Normalaus vystymosi atstatymas revertuojant *tbx5a^{tp158}* mutaciją su *Flp^o* rekombinaze

Norint patikrinti, ar *tbx5a^{tp158}* kamiene esanti mutageninė kasetė gali būti apversta *in vivo* panaudojus *Flp^o* rekombinazę, ir tokiu būdu atstatytas normalus širdies ir krūtininių pelekų vystymasis, vienos ląstelės stadijos embrionai (n = 92), gauti sukryžminus *tbx5a^{tp158/+}* su *UAS:mRFP* kamienu, buvo mikroinjekuoti su *Flp^o* mRNR (75 pg). Trijų dpf F0 lervos buvo apžiūrėtos po fluorescentiniu mikroskopu. Pastebėta, kad kai kurie embrionai pasižymėjo somatiniu mRFP mozaikiškumu ir/ arba švelnesniu krūtininių pelekų fenotipu (tai yra, ilgesniais krūtininiais pelekais) (7 pav.).

Visos lervos, kurios pasižymėjo teigiama mRFP raiška, buvo atrinktos auginimui. F0 suaugėliai, kurie turėjo švelnesnį krūtininių pelekų fenotipą, buvo sukryžminti su *UAS:mRFP* kamienu. F1 embrionai buvo atrinkti pagal mRFP

fluorescenciją ir suskaičiuoti. Jeigu mutageninė kasetė buvo sėkmingai apversta bent kai kuriose lytinėse ląstelėse, mažiau negu 50 % F1 embrionų turėtų pasižymėti mRFP raiška. Nustatyta, kad viena iš dėčių, kuri buvo gauta sukryžminus vieną iš F0 patelių su *UAS:mRFP* patinu, turėjo tik 13 % mRFP-teigiamų embrionų. Pirmoji dėtis gauta iš tos poros buvo panaudota atskirų embrionų genotipavimui.

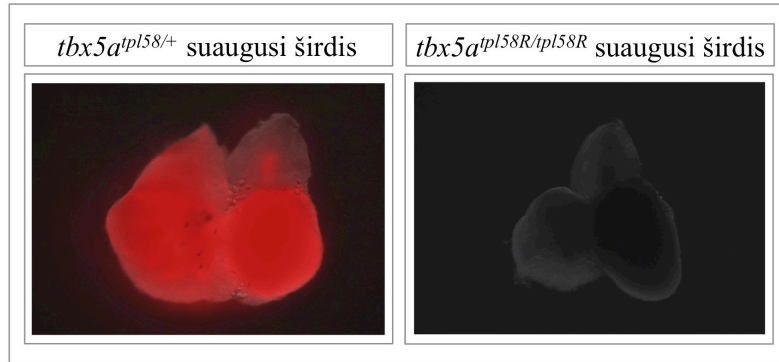


7 paveikslas. *Flp^o* mRNR mikroinjekcijos (75 pg) į vienos ląstelės *tbx5a^{tp158/+}* embrionus sukelia somatinį mozaikiškumą; a – kontrolinė lerva, b – mRFP raiškos sumažėjimas injekuotoje lervoje, c – švelnesnis krūtininių pelekų fenotipas injekuotoje lervoje (ilgesni krūtininiai pelekai).

Remiantis gautais genotipavimo rezultatais, trys iš šešiolikos lervų turėjo vieną *tbx5a^{tp158}* alelio kopiją su apversta mutagenine kasete (*tbx5a^{tp158R/+}*). Nustatyta, kad visi trys mRFP-teigiami embrionai buvo *tbx5a^{tp158/+}*, o likę dvylika embrionų - laukinio tipo individai. Laukinio tipo alelis pasižymėjo polimorfiškumu, kuris galbūt galėtų būti susijęs su krūtininių pelekų redukcijos lygiu. Sekoskaitai nusiųstų DNR sekų (*tbx5a^{tp158}*, *tbx5a^{tp158R}* ir dviejų skirtingo dydžio laukinio tipo) analizė patvirtino preliminarius genotipavimo rezultatus.

Siekiant įsteigti pilnai revertuotą *tbx5a^{tp158R}* kamieną, ta pati F0 patelė buvo dar kartą sukryžmintą su *UAS:mRFP* patinu. Gauti F1 palikuonys buvo atrinkti pagal mRFP raišką, ir mRFP-neigiami F1 embrionai buvo palikti auginimui.

Suaugusios F1 mRFP-neigiamos žuvys buvo genotipuotos naudojant trijų pradmenų PGR. Vėliau, $tbx5a^{tp158R/+}$ buvo sukryžmintos tarpusavyje, jų palikuonys užauginti ir genotipuoti.



8 paveikslas. Palyginti su suaugusios $tbx5a^{tp158/+}$ širdimi, suaugusios $tbx5a^{tp158R/tp158R}$ homozigotos širdis pasižymi normalia morfologija ir neturi mRFP raiškos, kas parodo, kad $tbx5a^{tp158}$ mutacija yra išjungta.

Nustatyta, kad suaugusios pilnai revertuotos $tbx5a^{tp158R/tp158R}$ neturėjo mRFP raiškos ir nepasižymėjo jokia akivaizdžiu fenotipu. Remiantis morfologinės/ anatominės analizės rezultatais, visos žuvys turėjo normalią širdį (8 pav.) ir normalius krūtininius pelekus. Taigi $tbx5a^{tp158}$ mutacijos išjungimas $tbx5a$ lokuse atstatė normalų krūtininių pelekų ir širdies vystymąsi žuvies embrionuose, o užaugintų žuvų morfologija/ anatomija nesiskyrė nuo laukinio tipo individų.

2. 6. -3.3nkx2.5 ir -6.1nkx2. aktyvumo analizė normalaus širdies vystymosi metu

Žinoma, kad $nkx2.5$ geno raiškos lokalizacija stuburiniuose gyvūnuose sutampa su širdies kamieninių ląstelių padėtimi (Chen & Fishman, 1996; Lee et al., 1996). Remiantis publikuotais *in vitro* tyrimų duomenimis, $nkx2.5$ geno raiška atsiranda anksčiausiai iš visų žinomų širdies žymeklių (Komuro & Izumo, 1993;

Lints et al., 1993). *D. rerio* organizme *nkx2.5* žymi nesubrendusius kardiomiocitus ištiesai per visas širdies vystymosi stadijas. Šio geno transkripcija taip pat išlieka aktyvi suaugusios žuvies širdyje (Chen & Fishman, 1996; Raya et al., 2003). Dėl šių savybių, *nkx2.5* promotorius yra potencialiai naudingas kaip genetinis įrankis, kuris galėtų būti naudojamas įvairių baltymų raiškos reguliacijai širdyje.

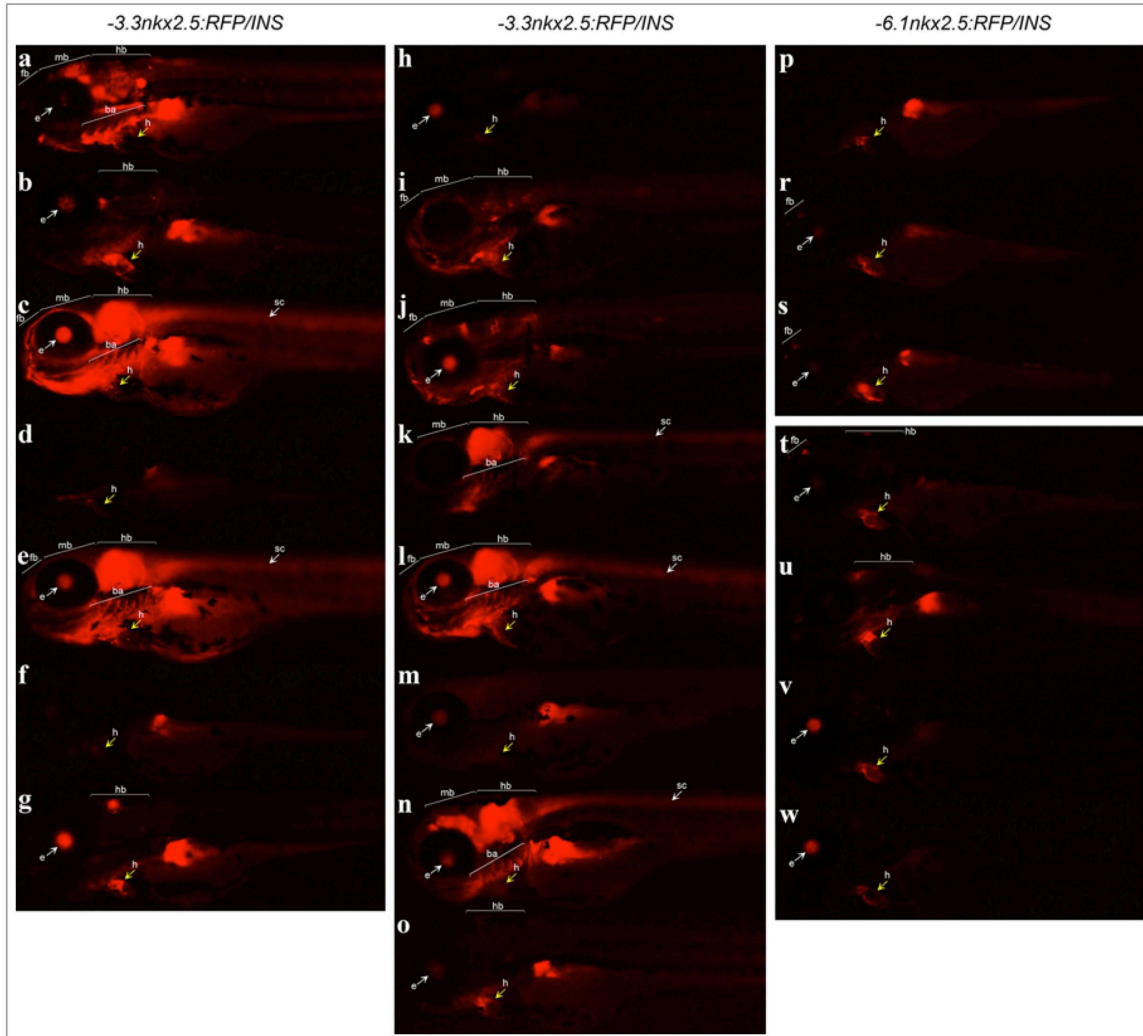
Norint charakterizuoti *nkx2.5* reguliacinius DNR regionus, buvo sukurti -3.3*nkx2.5:RFP-pA/INS* ir -6.1*nkx2.5:RFP-pA/INS* transgeniniai kamienai. Nustatyta, kad abu DNR fragmentai gali aktyvinti mRFP transkripciją besivystančioje trijų dpf žuvies širdyje. Taigi abu patikrinti genominiai regionai turi širdžiai specifinių stipriklių, kurie veikia širdies vystymosi metu. Tačiau abiejuose transgeniniuose kamieniuose mRFP raiška neapsiribojo širdies sritimi ir buvo aptikta akyse, priekinėse ir užpakalinėse smegenyse.

Skirtingai negu -3.3*nkx2.5:RFP-pA/INS*, visos -6.1*nkx2.5:RFP-pA/INS* F2 lervos pasižymėjo ryškia mRFP raiška širdyje. Dvi iš trijų -6.1*nkx2.5:RFP-pA/INS* F2 šeimų turėjo ryškią mRFP raišką skilvelyje ir prieširdyje (9 pav.: t, v, w), o viena šeima - tik arteriniame gumbe (9 pav.: u) (Grajevskaja et al., 2013). mRFP raiška taip pat buvo aptikta kituose audiniuose. Visi -6.1*nkx2.5:RFP-pA/INS* F2 embrionai turėjo mRFP-teigiamas akis. Dviem iš trijų -6.1*nkx2.5:RFP-pA/INS* F2 šeimų buvo būdinga lokalizuota mRFP raiška užpakalinėse smegenyse, o vienai – priekinėse smegenyse.

Skirtingai negu -6.1*nkx2.5:RFP-pA/INS* individuose, -3.3*nkx2.5:RFP-pA/INS* kamiene, mRFP raiška taip pat buvo aptikta žiauniniuose lankuose, vidurinėse ir nugaros smegenyse, krūtininiuose pelekuose (9 pav). Kai kuriems -3.3*nkx2.5:RFP-pA/INS* individams taip pat buvo būdinga mRFP raiška visuose audiniuose. Tuo tarpu -6.1*nkx2.5:RFP-pA/INS* embrionuose tokios plačios mRFP raiškos lokalizacijos nebuvo pastebėta.

Dviejų potencialių *nkx2.5* geno promotoriaus regionų, -3.3 kb ir -6.1 kb, analizė parodė, kad ilgesnis genominis fragmentas yra labiau specifinis širdžiai: sukelia ryškią mRFP raišką embrioninėje širdyje, bet ne kituose organuose ir

audiniuose. Aukštesnė raiškos tipų įvairovė, kuri buvo būdinga lervoms su -3.3 kb reguliacine seka, leidžia manyti, kad šis DNR regionas yra jautresnis chromosominės pozicijos efektui (Grajevskaja et al., 2013).



9 paveikslas. mRFP raiška *-3.3nkx2.5:RFP-pA/INS* ir *-6.1nkx2.5:RFP-pA/INS* transgeninėse trijų dpf *D. rerio* lervose: a - g *-3.3nkx2.5:RFP-pA/INS* F1 palikuonys (a tėvas A; b - d tėvas B; e - g tėvas C), h - o *-3.3nkx2.5:RFP-pA/INS* F2 palikuonys (h tėvas A; i - m tėvas B, n, o tėvas C), p - s *-6.1nkx2.5:RFP-pA/INS* F1 palikuonys (p tėvas A; r tėvas B; s tėvas C), t - w *-6.1nkx2.5:RFP-pA/INS* F2 palikuonys (t tėvas A; u, v tėvas B, w tėvas C). Lervos gautos iš skirtingų F0 tėvų, kurie buvo injekuoti su ta pačia plazmide, turėtų pasižymėti

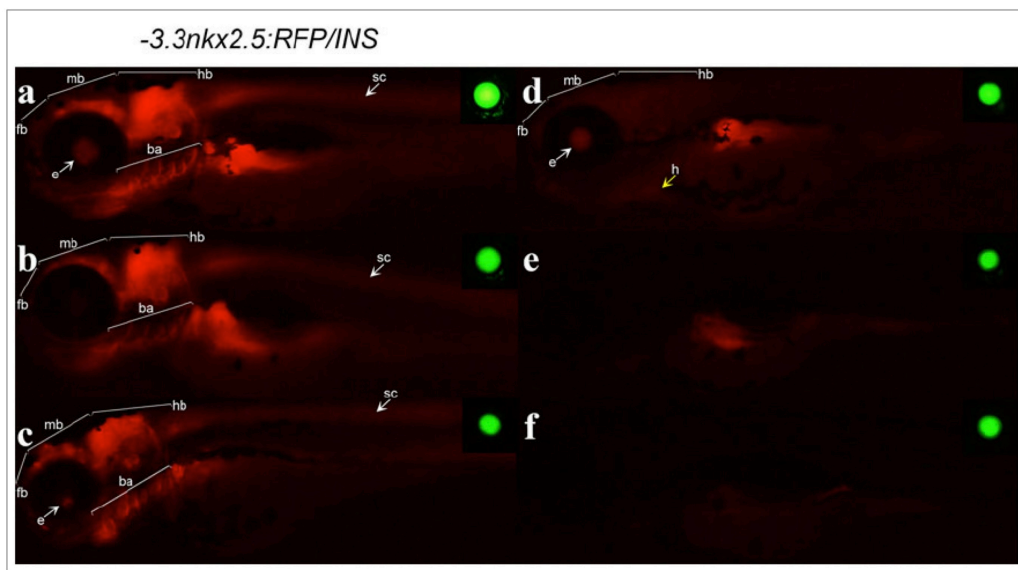
skirtinga transgeninės konstrukcijos integracijos vieta genome. Geltonosios rodyklės nurodo širdžiai specifinę mRFP raišką. Sutrumpinimai: *ba* žiauniniai lankai, *e* akis, *fb* priekinės smegenys, *h* širdis, *hb* užpakalinės smegenys, *mb* vidurinės smegenys, *sc* nugaros smegenys (Grajevskaja et al., 2013).

2. 7. Viščiuko β -globino insuliatorių veiklos analizė žuvies genome normalios kardiogenezės metu

Transgeninių konstrukcijų jautrumas stipriklių ir slopintuvų poveikiui sąlygoja dažnai stebimą “margumą”, kuris išlieka svarbia kliūtimi tyrinėjant genų raiškos pasiskirstymą ir intensyvumą. Norint gauti palyginamus ir atkartojamus duomenis, yra reikalinga strategija, kuri leistų apsaugoti transgeną nuo endogeninių reguliacinių elementų. Vienu iš potencialių sprendimų galėtų būti insuliacinių elementų naudojimas transgeno apsaugai. Chung ir kolegos (1993) parodė, kad viščiuko hyperjautraus saito-4 insuliacinės sekos (cHS4) (1.2 kb), gautos iš *Gallus gallus* β -globino lokuso, gali būti sėkmingai panaudotos heterochromatino plitimui slopinti ir transgeniui apsaugoti nuo transkriptiškai aktyvių domenų vaisinėje muselėje ir žmogaus eritroidinėse ląstelėse. Vėliau buvo nustatyta, kad 250 bp CpG regionas cHS4 sekoje yra atsakingas už pagrindinį insuliacinį aktyvumą (Chung et al., 1997).

Norint patikrinti ar cHS4 insuliacinės sekos gali apsaugoti transgeną nuo endogeninių reguliacinių elementų poveikio, cHS4 insulatoriai buvo klonuoti apsupant *-3.3nkx2.5:RFP-pA* ir *-6.1nkx2.5:RFP-pA* konstrukcijas iš abiejų pusių. Trys nepriklausomos šeimos, iš kurių kiekviena šeima pasižymėjo nepriklausoma konstrukcijos integracija, buvo sukurtos panaudojant abi *-3.3nkx2.5:RFP-pA* ir *-6.1nkx2.5:RFP-pA* konstrukcijas ir užaugintos. F1 šeimų kryžminimai su laukinio tipo žuvimis atskleidė, kad kai kurie kamienai turėjo daugiau negu vieną transgeno kopiją. Iš viso, nuo vieno iki penkių skirtingų mRFP raiškos tipų buvo aptinkama kiekvienoje šeimoje (Grajevskaja et al., 2013).

Kaip minėta anksčiau, *-3.3nkx2.5:RFP-pA/INS* kamiene mRFP raiškos pasiskirstymas vyravo nuo išskirtinai audiniams-specifinio, kai mRFP raiška buvo aptikta tik širdyje ir/ arba smegenyse, iki visapusiško, kai mRFP raiška buvo stebima daugumoje audinių (9 pav.). Jeigu kitų genų stiprikliai veikia šalia transgeno integracijos vietos, tai jie galėtų tiesiogiai aktyvinti *nkx2.5* šerdinį promotorių ir tokiu būdu reguliuoti mRFP raišką tam tikrose ląstelėse. Taigi tikėtina, kad aptikta raiškos įvairovė atkartoja kitų genų raišką.



10 paveikslas. mRFP ir GFP raiškos margumas tarp šešių atskirų tos pačios dėties lervų (a - f), kurios turi tik vieną *-3.3nkx2.5:RFP/INS* transgeno kopiją. Kiekvienos lervos akies lęšiukui būdinga GFP yra rodoma viršutiniame paveiksliuko kampe. Geltonoji rodyklė nurodo širdžiai specifinę mRFP raišką. Sutrumpinimai: *ba* žiauniniai lankai, *e* akis, *fb* priekinės smegenys, *h* širdis, *hb* užpakalinės smegenys, *mb* vidurinės smegenys, *sc* nugaros smegenys (Grajevskaja et al., 2013).

Pastebėtina, kad *-3.3nkx2.5:RFP-pA/INS* tos pačios dėties individai, turintys tik vieną transgeno kopiją, parodė įvairius mRFP raiškos lygius, kurie varijavo nuo ryškaus (10 pav.: a - c) iki vos pastebimo (10 pav.: d - f). Aptiktas

mRFP raiškos margumas koreliavo su akies lęšiukui būdingos GFP raiškos intensyvumu (10 pav.). Nevienodas mRFP raiškos pasiskirstymas ir intensyvumo lygis reiškia, kad *-3.3nkx2.5:RFP-pA/INS* transgeno genomine padėtis įtakoja jo reguliaciją.

Panašiai buvo nustatyta, kad *-6.1nkx2.5:RFP-pA/INS* transgeno raiška irgi priklauso nuo chromosominės pozicijos efekto. Tačiau lyginant su *-3.3nkx2.5:RFP-pA/INS*, *-6.1nkx2.5:RFP-pA/INS* lervos pasižymėjo pastovia širdžiai specifine mRFP raiška ir žemesniu margumu (9 pav.: p - w). Stebėtas "pagerėjimas" leidžia daryti prielaidą, kad ilgesnis *nkx2.5* promotoriaus fragmentas turi širdžiai būdingų stipriklių ir yra mažiau jautrus chromosominės pozicijos efektui. Tuo tarpu *-6.1 kb nkx2.5:RFP-pA* transgenas be insuliacinių sekų parodė aukštesnę širdžiai būdingą specifiškumą ir žemesnę mRFP raiškos lygį (9 pav.). Šis pastebėjimas leidžia manyti, jog patikrinti insuliaciniai elementai ne tik nesugeba apsaugoti transgeninius konstrukcijų nuo pozicijos efekto, bet taip pat potencialiai gali prisidėti prie padidėjusios transgeno raiškos.

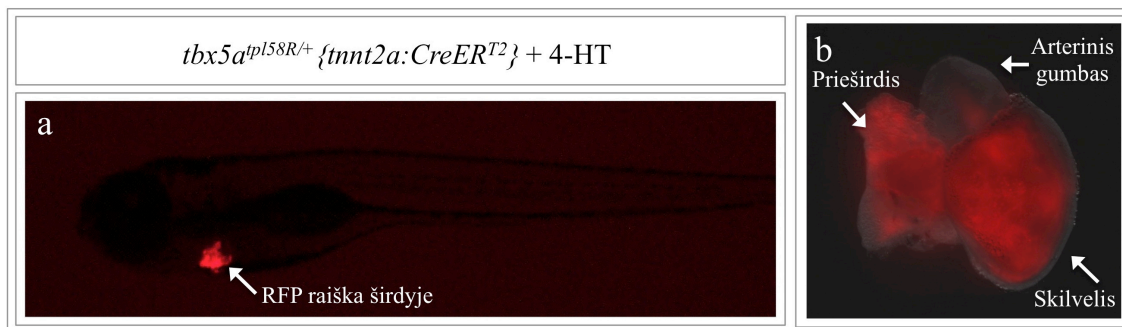
Gauti rezultatai parodė, kad cHS4 insulatoriai negali būti naudojami transgeninėms konstrukcijoms apsaugoti nuo chromosominės pozicijos efekto *D. rerio* genome širdies vystymosi metu. Šie duomenys prieštarauja Bessa ir kitų (2009) paskelbtiems rezultatams. Prieštaringi rezultatai gali būti paaiškinti tuo, kad Bessa ir kolegų (2009) atliko visus eksperimentus tik F0 embrionuose. Be to, Bessa ir kitų (2009) analizuojama promotoriaus seka buvo apsupta naudojant du skirtingus insuliacinius elementus, GAB ir cHS4. Tačiau atlikti tyrimai parodė, kad cHS4 insuliacinis elementas turi priešingą poveikį (skatina heterochromatino plitimą) transgeno raiškai žuvies genome normalios kardiogenezės metu. Toks pastebėjimas sutampa su publikuotais duomenimis, kurie buvo gauti atliekant tyrimus su pelėmis (Emery et al., 2000; Rivella et al., 2000; Yannaki et al., 2002; Yao et al., 2003; Rincon-Arano et al., 2007; Yahata et al., 2007; Ochiai et al., 2011; Sharma et al., 2012; Emery et al., 2013; Uchida et al., 2013).

2. 8. Sąlyginė *tbx5a^{tp158R}* lokuso re-mutacija besivystančios ir suaugusios žuvies širdyje

Siekiant ištirti ar *tbx5a^{tp158R}* mutacija gali būti re-mutuota specifiskai besivystančios žuvies širdyje, *tbx5a^{tp158R/tp158R}* individai buvo sukryžminti su *tnnt2a:CreER^{T2}* kamieniu. Visi embrionai, kurie pasižymėjo GFP raiška akies lęšiuke, visiškai neturėjo mRFP raiškos. Tai leidžia manyti, kad bent šioje vystymosi stadijoje CreER^{T2} baltymas neindukuoja rekombinacijos tarp modifikuotų *loxP* saitų *tbx5a^{tp158R}* lokuse, kai ląstelėje nėra 4-hidroksitamoksifeno (4-HT).

Po 24 valandų po inkubavimo 0.5µM 4-HT tirpale, *tbx5a^{tp158R/+}*; *tnnt2a:CreER^{T2}* lervos pasižymėjo mRFP raiška tik širdyje. Taigi nustatyta, kad insercinė *tbx5a^{tp158R}* mutacija gali būti sėkmingai re-mutuota būtent besivystančios žuvies širdyje (11 pav.: a). Visi mRFP-teigiami embrionai buvo užauginti. Atlikti skrodimai ir analizė po fluorescentiniu mikroskopu parodė, kad trijų mėnesių žuvų širdys irgi pasižymi mRFP raiška (n = 3). Tai leidžia manyti, kad bent dalis kardiomiocitų, kurie neturėjo vienos veikiančios *tbx5a* kopijos, nebuvo pašalinti iš širdies jos vystymosi metu. Nepaisant to, kad mRFP-teigiamos širdies raumens ląstelės išliko širdyje per jos vystymąsi, susiformavęs organas pasižymėjo normalia morfologija (11 pav.: b).

Norint patikrinti, ar panašiu būdu *tbx5a^{tp158}* mutacija gali būti re-mutuota specifiskai suaugusios žuvies širdyje, buvo sukurti *tbx5a^{tp158R/+}*; *tnnt2a:CreER^{T2}* ir *tbx5a^{tp158R/tp158R}*; *tnnt2a:CreER^{T2}* transgeniniai kamieniai. Praėjus vienai savaitei po inkubavimo, suaugėliai, kurie buvo inkubuoti 80 ml 5µM 4-HT tirpale tris kartus po 24 valandas, pasižymėjo širdžiai specifine mRFP raiška. Taigi *tbx5a* genas buvo sėkmingai re-mutuotas suaugusios žuvies širdyje. Gauti tyrimų rezultatai yra labai vertingi, nes pirmą kartą parodė sąlyginę mutacijos indukciją suaugusioje žuvelyje ir suteikė galimybę patikrinti, ar kardiogenezei būtinas genas, *tbx5a*, turi vaidmenį stuburinio organizmo širdies regeneracijos procese.



11 paveikslas. *tbx5a^{tp158}* lokuso re-mutacija besivystančios žuvies širdyje: a - 4-HT indukuota širdžiai specifinė mRFP raiška nurodo sėkmingą mutageninės kasetės apvertimą *tbx5a^{tp158R/+}* alelyje; b - trijų mėnesių žuvies mRFP-teigiama širdis pasižymi normalia morfologija; bent dalis besivystančios širdies ląstelių, kuriose *tbx5a^{tp158}* lokusas buvo re-mutuotas, išliko per kardiogenezę.

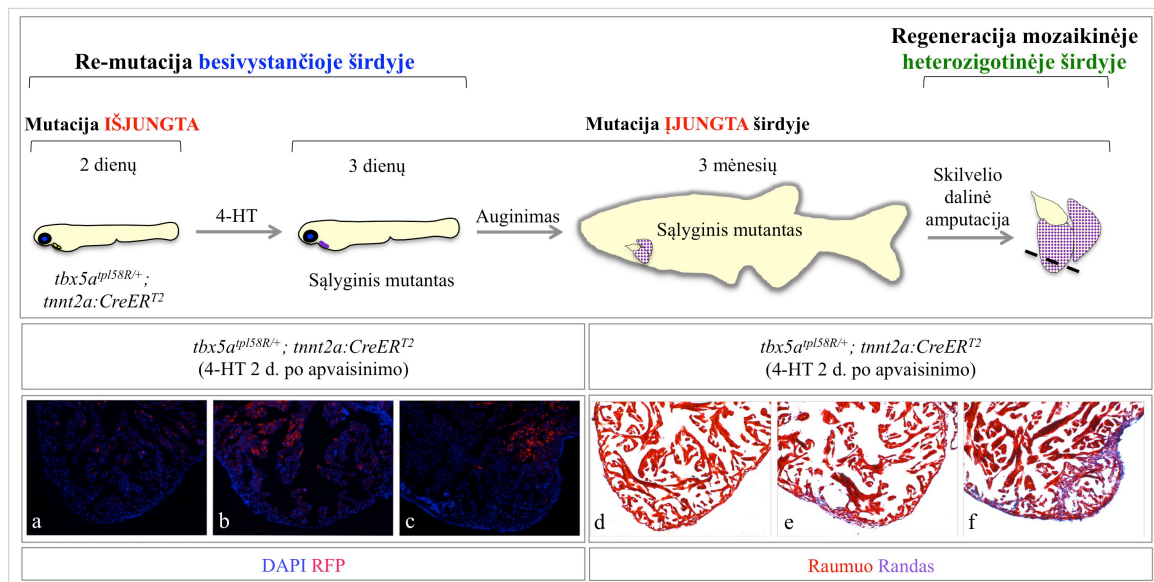
2. 9. Širdies regeneracijos tyrimai *tbx5a^{tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* sąlyginuose mutantuose

Kadangi *tbx5a* yra svarbus širdies vystymosi transkripcijos faktorius, šis genas gali vaidinti svarbų vaidmenį ir širdies regeneracijos mechanizmuose. Norint patikrinti šią hipotezę, dalinė širdies skilvelio amputacija buvo atlikta *tbx5a^{tp158/+}* suaugėliuose (n = 3). Nustatyta, kad praėjus vienam mėnesiui po pažeidimo, visi skilveliai turėjo žymų randą. Gauti duomenys leidžia manyti, kad *tbx5a* haplonepakankamumas daro neigiamą įtaką žuvies širdies regeneracijai. Tačiau, kita vertus, kadangi žinoma, jog *tbx5a^{tp158/+}* suaugėliai turi pilnai penetruojantį širdies fenotipą, neaišku, ar aptiktas regeneracijos defektas yra tiesioginė ar netiesioginė *tbx5a* haplonepakankamumo pasekmė.

Norint išsiaiškinti, ar *tbx5a* haplonepakankamumas sukelia regeneracijos defektus žuvies širdyje, pasižyminčioje normalia anatomija/ morfologija, buvo sukurti *tbx5a^{tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* sąlyginiai kamienai. Mutacijos indukcija besivystančios žuvies širdyje buvo įvykdyta inkubuojant dviejų dpf *tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}* embrionus 4-HT tirpale. Tuo tarpu mutacijos

indukcija suaugusios žuvies širdyje buvo atlikta laikant 2.5 mėnesio amžiaus $tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}$ ir $tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}$ individus 4-HT tirpale. Sėkmingai įjungus $tbx5a^{tp158R}$ mutaciją embrionų ir suaugėlių širdyse, trijų mėnesių amžiaus sąlyginiams mutantams buvo atlikta dalinė širdies skilvelio amputacija (Poss et al., 2002). Po trisdešimties dpa, sąlyginių mutantų širdys buvo iširtos.

Nustatyta, kad penkios iš septynių širdžių, kurios buvo išskrostos iš $tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}$ žuvų, inkubuotų 4-HT embrioninėje stadijoje, pasižymėjo sutrikusia širdies regeneracija (12 pav.). Pastebėtų regeneracijos defektų lygis varijavo. Trys skilveliai turėjo nežymias kolageno sankaupas pažeidimo srityje. Dvi širdys pasižymėjo dideliu randu, susiformavusiu skilvelio viršūnėje.

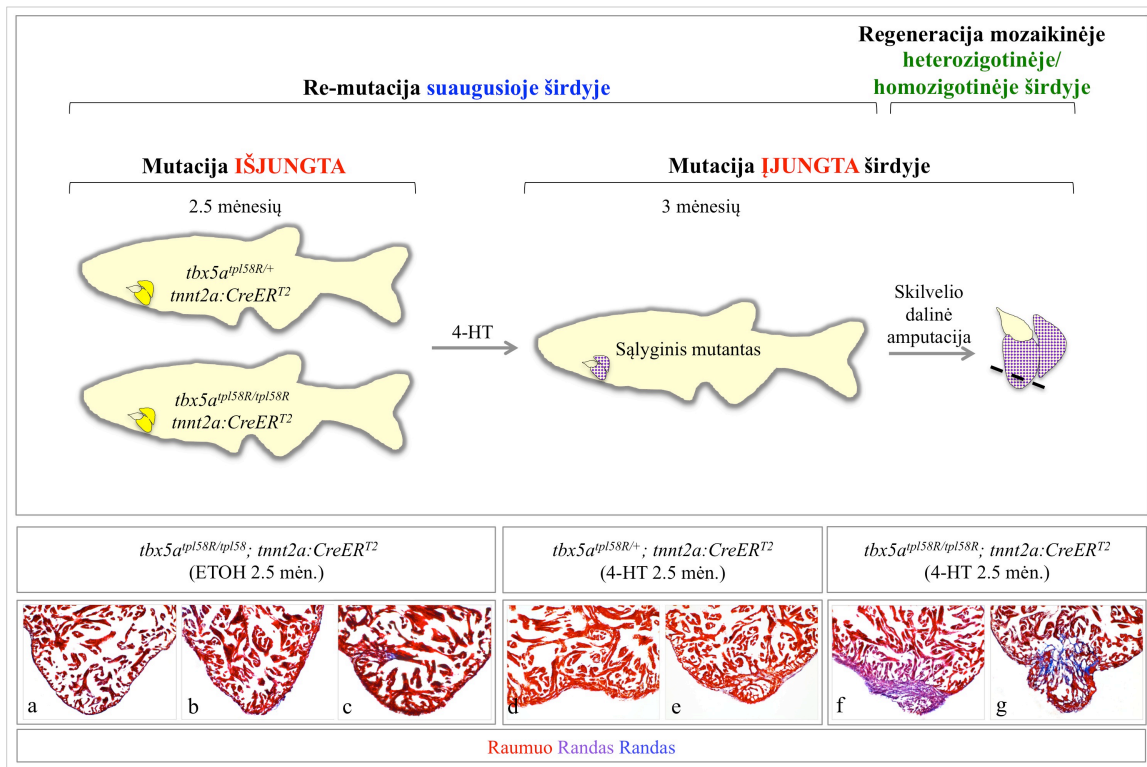


12 paveikslas. $tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}$ suaugėliai, kuriuose $tp158$ mutacija buvo indukuota besivystančioje širdyje, 30 dpa turėjo širdies regeneracijos defektus: a, d - visiškai regeneravęs širdies skilvelis; b, e - kolageno susikaupimai pažeidimo vietoje; c, f - randas pažeidimo vietoje. Pjūvių dažymo metodai: a - c DAPI, d - f Picro-Mallory.

Aptiktų fenotipų variacija gali būti paaiškinta širdžių mozaikiškumu revertertos $tbx5a^{tp158R}$ mutacijos atžvilgiu (12 pav.). Regeneracijos fenotipo pasireiškimas mozaikiniuose skilveliuose leidžia daryti prielaidą, kad $tbx5a$ yra reikalingas širdies regeneracijai. Tačiau, kadangi $tbx5a^{tp158}$ mutacija buvo indukuota vystymosi metu, vis dar išlieka tikimybė, jog aptikti regeneracijos morfologiniai defektai yra netiesioginė $tbx5a$ produkto trūkumo pasekmė.

Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad sąlyginiai $tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}$ ir $tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}$ mutantai, kuriuose $tbx5a^{tp158}$ mutacija buvo indukuota suaugusioje stadijoje, taip pat pasižymėjo sutrikusia širdies regeneracija. Palyginti su etanolyje inkubuotais kontroliniais $tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}$ individais (n = 7), kurie visiškai regeneravo dalinai amputuoto skilvelio viršūnę, 4-HT inkubuotos $tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}$ žuvis (n = 2) turėjo nežymius regeneracijos defektus: nedidelius kolageno susikaupimus pažeidimo srityje ir netaisyklingą skilvelio viršūnės formą. Be to, $tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}$ individai, kurie buvo laikyti 4-HT (n = 8), nesugebėjo atstatyti iš dalies pašalinto skilvelio viršūnės ir jų širdys pasižymėjo esminiais regeneracijos sutrikimais: didelio rando susiformavimu pažeidimo srityje ir stipriai deformuota skilvelio viršūne (13 pav.).

Atlikta statistinė analizė (“Fisher exact test of independence”) parodė, kad nulinė hipotezė, kuri teigia, jog širdies regeneracijos defektai atsiranda nepriklausomai nuo su 4-HT pagalba indukuojamos $tbx5a^{tp158}$ mutacijos, gali būti atmesta. Gauti rezultatai atskleidė, kad etanolio (mutacija išjungta) ir 4-HT tirpaluose (mutacija įjungta) laikytų $tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}$ žuvų širdies regeneracijos fenotipai patikimai skiriasi (p = 0.002). Kadangi 30 dpa širdies skilvelio morfologijos skirtumai tarp kontrolinės ir eksperimentinės grupės buvo reikšmingi, tai reiškia, kad $tbx5a$ genas yra reikalingas $tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}$ suaugėlių širdies regeneracijai.

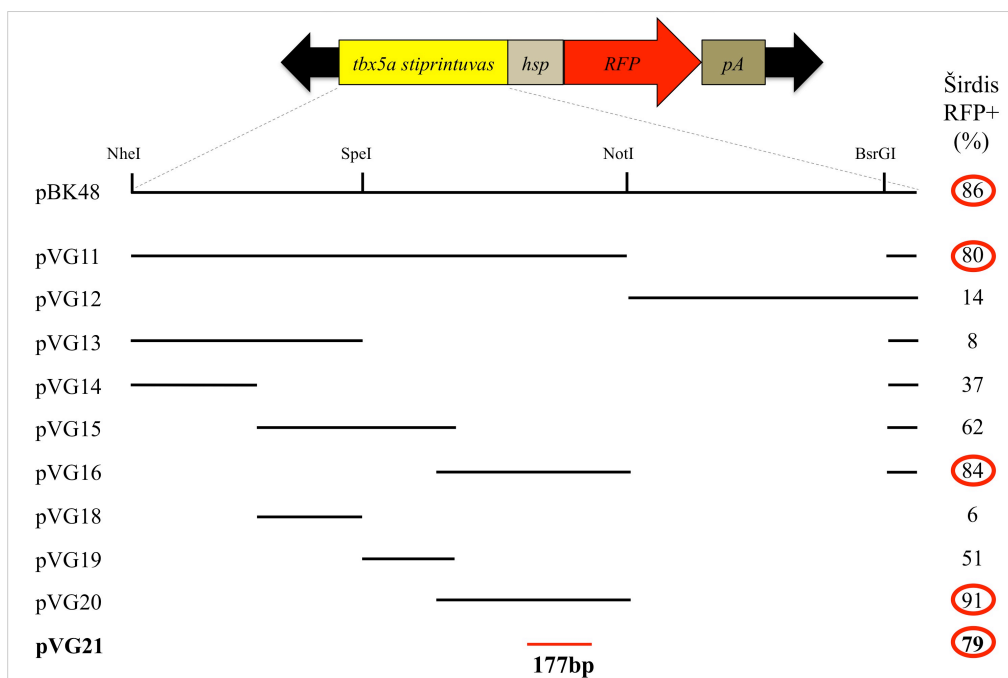


13 paveikslas. Palyginti su $tbx5a^{tp158R/tp158R}; tnnt2a:CreER^{T2}$ kontroliniais individais, kurie buvo laikyti etanolio tirpale, $tbx5a^{tp158R/tp158R}; tnnt2a:CreER^{T2}$ ir $tbx5a^{tp158R/+}; tnnt2a:CreER^{T2}$ žuvis, inkubuotos 4-HT tirpale, 30 dpa turėjo širdies regeneracijos defektus: a, b, c - visiškai regeneravęs širdies skilvelis; d, e – nežymios kolageno sankaupos pažeidimo vietoje; f, g - didelis randas pažeidimo vietoje; d, e, g - deformuota skilvelio viršūnė. Pjūviai buvo padažyti naudojant Picro-Mallory metodą.

Regeneracijos tyrimai, atlikti $tbx5a^{tp158R}; tnnt2a:CreER^{T2}$ su sąlyginiais mutantais, atskleidė, kad normali $tbx5a$ geno veikla yra būtina *D. rerio* širdies regeneracinių mechanizmų dalis. Per tyrimus įvykdyta pirmoji sąlyginės mutacijos indukcija suaugusioje žuvyje bei jos sėkmingas panaudojimas pagrindinio širdies vystymosi geno, $tbx5a$, vaidmeniui patikrinti regeneracijos procese padarė reikšmingą indėlį į regeneracijos tyrimus stuburiniuose organizmuose.

2. 10. Naujo minimalaus *tbx5a* stipriklio charakterizavimas *in vivo*

Transkripcijos stiprikliai, cis-reguliaciniai moduliai arba genominiai reguliaciniai elementai - tai yra DNR sekos, kurios reguliuoja laikinę ir erdvinę transkripcijos faktorių raišką stuburinių gyvūnų vystymosi ir ligos metu. Žinoma, kad mutacijos žmogaus stipriklių sekose sukelia taip vadinamas ‘enhanceropatijas’ (Smith & Shilatifard, 2014). Pavyzdžiui, Smemo ir kolegų (2012) identifikavo vieno nukleotido polimorfizmą nekoduojančiame regione, esančiame prieš *TBX5* geną, kuris sukelia širdies defektus susijusius su Holt-Oramo sindromu. Tačiau, nepaisant svarbios medicininės reikšmės, dauguma reguliacinių elementų iki šiol nėra atrasti.

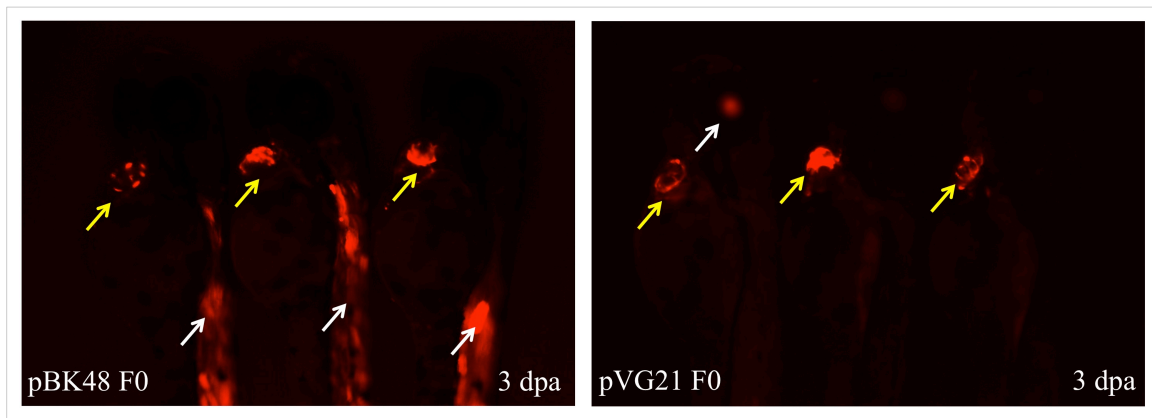


14 paveikslas. *tbx5a* stipriklio fragmentai, kurių reguliacinis aktyvumas buvo patikrintas *in vivo*.

Atskiri metodai naudojami reguliacinių elementų padėties numatymui genome gali remtis skirtingais duomenimis: motyvu ir konservacija, regulatoriaus

prisijungimu, chromatino prieinamumu, histonų modifikacija ir stipriklio-promotoriaus sąveika (Shlyueva et al., 2014). Epigenetinių žymių, tai yra, DNR metilinimo vietų, analizė buvo sėkmingai panaudota Dr. Balčiūno laboratorijoje potencialiems *tbx5a* geno reguliaciniams elementams atrasti. Ankstesni tyrimai atlikti Dr. Balčiūno laboratorijoje atskleidė 2309 bazių porų ilgio *tbx5a* stipriklio seką, esančią beveik 16 kilobazių porų prieš *tbx5a* transkripcijos pradžios vietą. Ši seka aktyvina mRFP raišką akyje, širdyje ir somituose (14 pav.: pBK48).

Norint nustatyti minimalią DNR seką, veikiančią kaip širdžiai specifinis stipriklis, anksčiau atrastas *tbx5a* reguliacinis regionas buvo padalintas į mažesnius fragmentus. Atskiri fragmentai buvo klonuoti prieš minimalų *heatshock* (*hst*) promotorių ir *mRFP* seką į stipriklių testavimo vektorių, (14 pav.). Sukurtos dešimt plazmidžių buvo mikroinjekuotos į laukinio tipo žuvies embrionus (n = 741). Iš viso, 77.3 % trijų dpf lervų (n = 474) pasižymėjo mRFP raiška.

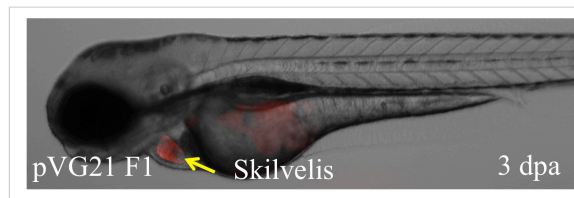


15 paveikslas. mRFP raiška trijų dpf *D. rerio* lervose, kurios buvo mikroinjekuotos su pBK48 (2309 bp *tbx5a* stipriklio seka) arba pVG21 (177 bp *tbx5a* stipriklio seka). Geltonoji rodyklė nurodo širdžiai specifinę mRFP raišką. Baltoji rodyklė nurodo mRFP raišką somituose arba akyje.

Daugiausiai F0 embrionų su mRFP-teigiama širdimi (91 %) buvo gauta mikroinjekuojant pVG20 plazmidę (14 pav). Tačiau mRFP raiška pasižymėjo ne

tik širdis, bet ir somitai. Embrionams, mikroinjekuotiems su pVG21 plazmide, buvo būdinga širdžiai specifinė mRFP raiškam (15 pav). mRFP fluorescencija taip pat buvo aptikta akies lęšiuke. Tai galėtų būti *hst* minimalaus promotoriaus “nutekėjimo” padarinys, kadangi žinoma, jog embrionai, injekuoti su kontroline stipriklių testavimo konstrukcija, irgi pasižymi mRFP raiška akies lęšiuke. Taigi buvo nustatyta, kad 177 bp *tbx5a* stipriklio regionas pVG21 plazmidėje yra užtenkamas mRFP raiškos aktyvinimui trijų dpf lervų širdyje (15 pav.).

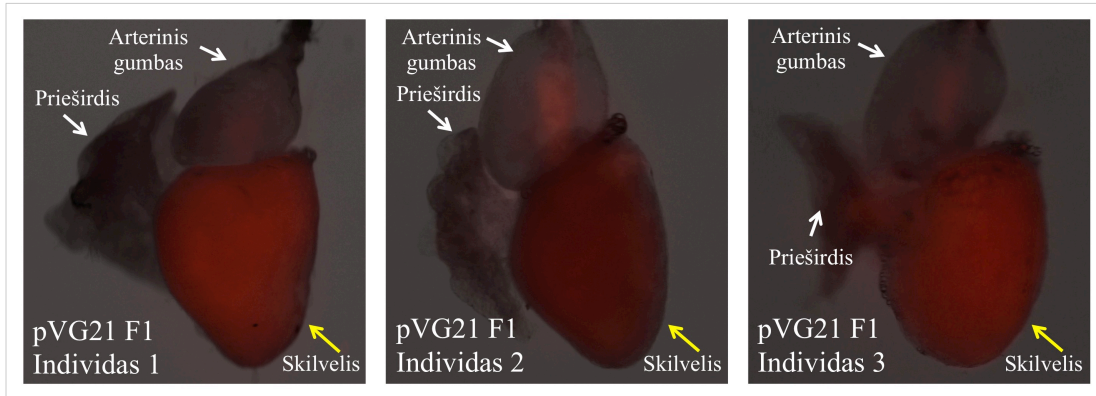
Sekančios pVG21 kartos embrionų analizė patvirtino preliminarius mikroinjekcijų rezultatus. Nustatyta, kad F1 lervos su minimaliu *tbx5a* stiprikliu pasižymi mRFP raiška širdyje. Svarbu paminėti, jog mRFP fluorescencija širdies skilvelyje buvo žymiai ryškesnė negu prieširdyje (n = 89) (16 pav). Panašus mRFP raiškos pasiskirstymas buvo aptiktas suaugusiųjų pVG21 F1 žuvų širdyse (n = 3) (17 pav).



16 paveikslas. Minimalus širdžiai specifinis *tbx5a* stipriklis aktyvina mRFP raišką besivystančios žuvies širdyje. Geltonoji rodyklė nurodo skilveliui specifinę mRFP raišką. Kadangi mRFP raiška prieširdyje buvo vos pastebima, ji nebuvo užfiksuota nuotraukoje.

Pastebėtina, kad identifikuotas minimalus *tbx5a* reguliacinis elementas turi 24 bp genominių regioną, kuris yra konservatyvus tarp žuvų. Kai potencialus Sox-5, Gata-1 ir/ arba Pbx1 transkripcijos faktorių prisijungimo motyvas, lokalizuotas konservatyviame regione, buvo mutuotas panaudojus CRISPR/Cas9 sistemą (Burg et al., 2016), mRFP raiška besivystančioje F1 embrionų širdyje žymiai sumažėjo.

Tai leidžia manyti, jog identifikuota seka gali turėti svarbų vaidmenį *tbx5a* geno reguliacijai širdies vystymosi metu.



17 paveikslas. Minimalus širdžiai specifinis *tbx5a* stipriklis aktyvina mRFP raišką suaugusios žuvies širdyje. Geltonosios rodyklės nurodo mRFP raišką skilvelyje. Silpnesnė mRFP raiška buvo aptikta prieširdyje. Nuotraukose matoma mRFP fluorescencija arteriniame gumbė yra autofluorescencija, kurios šaltinis yra kraujas.

Išvados

1. Šeši inserciniai kamienai buvo sėkmingai charakterizuoti naudojant aPGR ir 5'RACE metodus. Genų gaudyklės integracijos buvo aptiktos šešiuose skirtinguose genuose: *fli1b*, *pdlim7*, *smndc1*, *ENSDART00000112671*, *ENSDART00000114996*, ir *ENSDART00000111400*.
2. Nustatyta, kad kraujagyslių regeneracija *fli1b*^{tp150} insercinėse žuvyse vyksta normaliai. Pastebėtas GFP raiškos lygio padidėjimas kraujagyslėse ir kai kuriose kraujo ląstelėse 7 dpa leidžia daryti prielaidą, kad *fli1b* galėtų būti reikalingas kraujagyslių regeneracijai, bet šio geno vaidmuo tikriausiai yra kompensuojamas jo paralogo, *fli1a*.
3. Atskleista, kad *-3.3nkx2.5* ir *-6.1nkx2.5* promotoriaus regionai turi širdžiai specifinių stipriklių, kurie gali aktyvinti reporterio raišką 3 dpf lervose per normalų žuvies širdies vystymąsi. Tačiau, abu *nkx2.5* fragmentai negali būti naudojami kaip širdies specifiniai promotoriai Cre rekombinazės raiškai, nes jie taip pat sąlygoja ektopinę mRFP raišką kituose audiniuose: akyje, smegenyse, ir žiauniniuose lankuose.
4. Nustatyta, kad viščiuko β -globino insuliacinės sekos neapsaugo *-3.3nkx2.5:RFP/INS* ir *-6.1nkx2.5:RFP/INS* transgenų nuo chromosominės pozicijos efekto *D. rerio* genome normalios kardiogenezės metu. To rezultatas, embrionai turintys transgeno integraciją toje pačioje arba skirtingose genomo vietose pasižymi varijuojančiu mRFP raiškos pasiskirstymu, intensyvumu ir margumu.
5. *tbx5a*^{tp158R}; *tnnt2a:CreER*^{T2} embrionų ir suaugėlių inkubavimas 4-hidroksitamoksifeno tirpale indukuoja rekombinaciją tarp *lox71* ir *lox66* saitų, apverčia mutageninę kasetę, ir sąlygoja sėkmingą *tbx5a*^{tp158R} lokuso re-mutaciją specifiskai širdyje. Be to, pirmą kartą buvo parodyta, kad "loss of function" mutacija gali būti indukuota ne tik embrionuose, bet ir suaugusioje žuvyje.

6. *tbx5a*^{tp158R}; *tnnt2a:CreER*^{T2} sąlyginiai mutantai, kurių širdys yra mozaikinės *tbx5a*^{tp158R/tp158R}, *tbx5a*^{tp158R/tp158}, ir *tbx5a*^{tp158/tp158} kardiomiocitų atžvilgiu, pasižymi esminiais regeneracijos sutrikimais: dideliu randu ir deformuota skilvelio viršūne. Aptikti širdies regeneracijos defektai parodo, kad *tbx5a* vaidina esminį vaidmenį žuvies širdies regeneracijos procese.
7. Minimalus 177 bp *tbx5a* stipriklis, kuris yra lokalizuotas maždaug 16 kilobazių porų prieš *tbx5a* geną, aktyvina širdies specifinę mRFP raišką besivystančioje ir suaugusioje žuvyje. Nustatytas *tbx5a* stipriklio aktyvumas leidžia manyti, kad ši reguliatorinė seka gali turėti vaidmenį *tbx5a* geno reguliacijai per kardiogenezę, homeostazę bei širdies regeneraciją.

Naudotų literatūros šaltinių sąrašas

- Ahn DG, Kourakis MJ, Rohde LA, Silver LM, Ho RK. 2002. T-box gene *tbx5* is essential for formation of the pectoral limb bud. *Nature*. 417(6890):754-8.
- Bakkers J. 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc Res*. 91(2):279-88.
- Balciuniene J, Nagelberg D, Walsh KT, Camerota D, Georlette D, Biemar F, Bellipanni G, Balciunas D. 2013. Efficient disruption of Zebrafish genes using a Gal4-containing gene trap. *BMC Genomics*. 14:619.
- Basson CT, Huang T, Lin RC, Bachinsky DR, Weremowicz S, Vaglio A, Bruzzone R, Quadrelli R, Lerone M, Romeo G, Silengo M, Pereira A, Krieger J, Mesquita SF, Kamisago M, Morton CC, Pierpont ME, Müller CW, Seidman JG, Seidman CE. 1999. Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(6):2919-24.
- Bessa J, Tena JJ, de la Calle-Mustienes E, Fernández-Miñán A, Naranjo S, Fernández A, Montoliu L, Akalin A, Lenhard B, Casares F, Gómez-Skarmeta JL. 2009. Zebrafish enhancer detection (ZED) vector: a new tool to facilitate transgenesis and the functional analysis of cis-regulatory regions in zebrafish. *Dev Dyn*. 238(9):2409-17.
- Brand T. 2003. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. 2003. *Dev Biol*. 258(1):1-19.
- Brown DD, Martz SN, Binder O, Goetz SC, Price BM, Smith JC, Conlon FL. 2005. *Tbx5* and *Tbx20* act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development*. 132(3):553-63.
- Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. 2001. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell*. 106(6):709-21.

- Bruneau BG. 2002. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res.* 90(5):509-19.
- Burg, L., Zhang, K., Bonawitz, T., Grajevskaja, V., Bellipanni, G., Waring, R., Balciunas, D. 2016. Internal epitope tagging informed by relative lack of sequence conservation. *Sci. Rep.* 6: 36986.
- Camarata T, Krcmery J, Snyder D, Park S, Topczewski J, Simon HG. 2010. Pdlim7 (LMP4) regulation of Tbx5 specifies zebrafish heart atrio-ventricular boundary and valve formation. *Dev. Biol.* 337(2): 233-245.
- Chablais F, Veit J, Rainer G, Jaźwińska A. 2011. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev Biol.* 11:21.
- Chablais F, Jaźwińska A. 2012. Induction of myocardial infarction in adult zebrafish using cryoinjury. *J Vis Exp.* (62): 3666.
- Chen J Fishman MC. 1996. Zebrafish *tinman* homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation. *Development.* 122, 3809-3816.
- Choi WY, Poss KD. 2012. Cardiac regeneration. *Curr Top Dev Biol.* 100:319-44.
- Choi WY, Gemberling M, Wang J, Holdway JE, Shen MC, Karlstrom RO, Poss KD. 2013. In vivo monitoring of cardiomyocyte proliferation to identify chemical modifiers of heart regeneration. *Development.* 140(3):660-6
- Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G. 1993. A 5' Element of the Chicken β -Globin Domain Serves as an Insulator in Human Erythroid Cells and Protects against Position Effect in *Drosophila*. *Cell.* 74: 505 – 514.
- Clark KJ, Geurts AM, Bell JB, Hackett PB. 2004. Transposon vectors for gene-trap insertional mutagenesis in vertebrates. *Genesis.* 39(4):225-33.
- Clark KJ, Balciunas D, Pogoda HM, Ding Y, Westcot SE, Bedell VM, Greenwood TM, Urban MD, Skuster KJ, Petzold AM, Ni J, Nielsen AL, Patowary A, Scaria V, Sivasubbu S, Xu X, Hammerschmidt M, Ekker SC. 2011. In vivo protein trapping produces a functional expression codex of the vertebrate proteome. *Nat Methods.* 8(6):506-15.
- Craig MP, Grajevskaja V, Liao HK, Balciuniene J, Ekker SC, Park JS, Essner JJ,

- Balciunas D, Sumanas S. 2015. Etv2 and Fli1b Function Together as Key Regulators of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35(4): 865-76.
- Emery DW, Yannaki E, Tubb J, Nishino T, Li Q, Stamatoyannopoulos G. 2013. Development of virus vectors for gene therapy of β chain hemoglobinopathies: flanking with a chromatin insulator reduces γ -globin gene silencing in vivo. *Blood.* 100(6):2012-2019.
- Fang Y, Gupta V, Karra R, Holdway JE, Kikuchi K, Poss KD. 2013. Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early Jak1/Stat3 injury response required for zebrafish heart regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(33):13416-21.
- Garrity DM, Childs S, Fishman MC. 2002. The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development.* 129(19):4635-45.
- Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD. 2013. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet.* 29(11):611-20.
- Gibson-Brown JJ, Agulnik S, Silver LM, Papaioannou VE. 1998. Expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 during chick organogenesis. *Mech Dev.* 74(1-2):165-9.
- González-Rosa JM, Martín V, Peralta M, Torres M, Mercader N. 2011. Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. *Development.* (9):1663-74.
- Grajevskaja V, Balciuniene J, Balciunas D. 2013. Chicken β -globin insulators fail to shield the nkx2.5 promoter from integration site effects in zebrafish. *Mol Genet Genomics.* 288(12):717-25.
- Gupta V, Poss KD. 2012. Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis. *Nature.* 484(7395):479-84.
- Gupta V, Gemberling M, Karra R, Rosenfeld GE, Evans T, Poss KD. 2013. An injury-responsive gata4 program shapes the zebrafish cardiac ventricle.

- Curr Biol.* 23(13):1221-7.
- Hermanson S, Davidson AE, Sivasubbu S, Balciunas D, Ekker SC. 2004. Sleeping Beauty transposon for efficient gene delivery. *Methods Cell Biol.* 77:349-362.
- Horb ME, Thomsen GH. 1999. Tbx5 is essential for heart development. *Development.* 126(8):1739-51.
- Horton AC, Mahadevan NR, Minguillon C, Osoegawa K, Rokhsar DS, Ruvinsky I, de Jong PJ, Logan MP, Gibson-Brown JJ. 2008. Conservation of linkage and evolution of developmental function within the Tbx2/3/4/5 subfamily of T-box genes: implications for the origin of vertebrate limbs. *Dev Genes Evol.* 218(11-12):613-28.
- Hu N, Sedmera D, Yost HJ, Clark EB. 2000. Structure and function of the developing zebrafish heart. *Anat Rec.* 260(2):148-57.
- Huang Y, Harrison MR, Osorio A, Kim J, Baugh A, Duan C, Sucov HM, Lien CL. 2013. Igf Signaling is Required for Cardiomyocyte Proliferation during Zebrafish Heart Development and Regeneration. *PLoS One.* 8(6):e67266.
- Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell.* 142(3):375-86.
- Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. 2010. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature.* 464(7288):606-9.
- Jopling C, Suñé G, Faucherre A, Fabregat C, Izpisua Belmonte JC. 2012. Hypoxia induces myocardial regeneration in zebrafish. *Circulation.* 126(25):3017-27.
- Jopling C, Suñé G, Morera C, Izpisua Belmonte JC. 2012. p38 α MAPK regulates myocardial regeneration in zebrafish. *Cell Cycle.* 11(6):1195-201.

- Kikuchi K, Gupta V, Wang J, Holdway JE, Wills AA, Fang Y, Poss KD. 2011. *tcf21+* epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration. *Development*. 138(14):2895-902.
- Komuro I, Izumo S. 1993. *Csx*: A murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Developmental Biology*. 90:8145-8149.
- Lee K H, Xu Q, Breitbart RE. 1996. A new *tinman*-Related Gene, *nkx2.7*, Anticipates the Expression of *nkx2.5* and *nkx2.3* in Zebrafish Heart and Pharyngeal Endoderm. *Developmental Biology*. 180:722-731.
- Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, Burns CG, Poss KD. 2006. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*. 127(3):607-19.
- Lien CL, Schebesta M, Makino S, Weber GJ, Keating MT. 2006. Gene expression analysis of zebrafish heart regeneration. *PLoS Biol*. 4(8):e260.
- Lints TJ, Parson LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. 1993. *Nkx2-5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*. 119, 419-431.
- Liu J, Stainier DY. 2010. *Tbx5* and *Bmp* signaling are essential for proepicardium specification in zebrafish. *Circ Res.*;106(12):1818-28.
- Lohr JL, Yost HJ. 2000. Vertebrate model systems in the study of early heart development: *Xenopus* and zebrafish. *Am J Med Genet*. 97(4):248-57.
- Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek AP, Woutersen RA. 2011. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol Pathol*. 39(5):759-75.
- Newbury-Ecob RA, Leanage R, Raeburn JA, Young ID. 1996. Holt-Oram syndrome: a clinical genetic study. *J Med Genet*. 33(4):300-7.
- Ochiai H, Harashima H, Kamiya H. 2011. Effects of insulator *chs4* on transgene expression from plasmid DNA in a positive feedback system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 112(5): 432-434.
- Poss KD, Wilson LG, Keating MT. 2002. Heart regeneration in zebrafish. *Science*. 298(5601):2188-90.

- Poznanski AK, Gall JC Jr, Stern AM. 1970. Skeletal manifestations of the Holt-Oram syndrome. *Radiology*. 1970 Jan;94(1):45-53.
- Raya A, Koth CM, Büscher D, Kawakami Y, Itoh T, Raya RM, Sternik G, Tsai HJ, Rodríguez-Esteban C, Izpisua-Belmonte JC. 2003. Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 Suppl 1:11889-95.
- Rincón-Arano H, Furlan-Magaril M, Recillas-Targa F. 2007. Protection against telomeric position effects by the chicken cHS4 beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(35):14044-9.
- Rivella S, Callegari J A, May C, Tan C W, Sadelain M. 2000. The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal sites. *Journal of Virology*. 74(10):4679-4687.
- Scott I C, Yelon D. 2010. Cardiac Development in the Zebrafish. Heart Evolution. Heart Development and Regeneration. *Elsevier Inc*. 103-120.
- Schnabel K, Wu CC, Kurth T, Weidinger G. 2011. Regeneration of cryoinjury induced necrotic heart lesions in zebrafish is associated with epicardial activation and cardiomyocyte proliferation. *PLoS One*. 6(4):e18503.
- Sharma N, Hollensen A K, Bak R O, Staunstrup N H, Schroder, Mikkelsen J G. 2012 The impact of cHS4 Insulators on DNA Transposon Vector Mobilization and Silencing in Retinal Pigment Epithelium Cells. *PloS One*. 7(10):e48421.
- Shlyueva D, Stampfel G, Stark A. 2014. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Genet* 15(4):272-86.
- Smemo S, Campos LC, Moskowitz IP, Krieger JE, Pereira AC, Nobrega MA. 2012. Regulatory variation in a TBX5 enhancer leads to isolated congenital heart disease. *Hum Mol Genet*. 21(14):3255-63.
- Smith E, Shilatifard A. 2014. Enhancer biology and enhanceropathies. *Nat Struct Mol Biol*. 21(3):210-9.

- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 83(1):13-34.
- Srivastava D. 2006. Genetic regulation of cardiogenesis and congenital heart disease. *Annu Rev Pathol.*1:199-213.
- Stainier DY. 2001. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat Rev Genet.* 2(1):39-48.
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature.* 291(5813):293-6.
- Takeuchi JK, Ohgi M, Koshiba-Takeuchi K, Shiratori H, Sakaki I, Ogura K, Saijoh Y, Ogura T. 2003. *Tbx5* specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development.* 130(24):5953-64.
- Uchida N, Hanawa H, Yamamoto M, Shimada T. 2013. The chicken hypersensitivity site 4 core insulator blocks promoter interference in lentiviral vectors. *Hum Gene Ther Methods.* 24(2):117-24.
- Wang J, Panáková D, Kikuchi K, Holdway JE, Gemberling M, Burris JS, Singh SP, Dickson AL, Lin YF, Sabeh MK, Werdich AA, Yelon D, Macrae CA, Poss KD. 2011. The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development.* 138(16):3421-30.
- Wang J, Karra R, Dickson AL, Poss KD. 2013. Fibronectin is deposited by injury-activated epicardial cells and is necessary for zebrafish heart regeneration. *Dev Biol.* 382(2):427-35.
- Wang Z, Dai M, Wang Y, Cooper KL, Zhu T, Dong D, Zhang J, Zhang S. 2014. Unique expression patterns of multiple key genes associated with the evolution of mammalian flight. *Proc Biol Sci.* 281(1783):20133133.
- Yahata K, Maeshima K, Sone T, Ando T, Okabe M, Imamoto N, Imamoto F. 2007. *CHS4* insulator-mediated alleviation of promoter interference during

- cell-based expression of tandemly associated transgenes. *J Mol Biol.* 374(3):580-90.
- Yannaki E, Tubb J, Aker M, Stamatoyannopoulos G, Emery DW. 2002. Topological constraints governing the use of the chicken HS4 chromatin insulators in oncoretrovirus vectors. *Molecular Therapy.* 5:589-598.
- Yao S, Osborne C S, Bharadwaj RP, Pasceri P, Sukonnik T, Pannell D, Recillas-Targa F, West AG, Ellis J. 2003. Retrovirus silencer blocking by the cHS4 insulator is CTCF independent. *Nucleic Acids Research.* 31(18): 5317-5323.
- Yonei-Tamura S, Tamura K, Tsukui T, Izpisua Belmonte JC. 1999. Spatially and temporally-restricted expression of two T-box genes during zebrafish embryogenesis. *Mech Dev.* 80(2):219-21.
- Zhang R, Han P, Yang H, Ouyang K, Lee D, Lin YF, Ocorr K, Kang G, Chen J, Stainier DY, Yelon D, Chi NC. 2013. *Nature.* 498(7455):497-501.
- Zhao L, Borikova AL, Ben-Yair R, Guner-Ataman B, MacRae CA, Lee RT, Burns CG, Burns CE. 2014. Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. *Proc Natl Sci USA.* 111(4):1403-8.

Mokslinės Publikacijos

- Burg, L., Zhang, K., Bonawitz, T., Grajevskaja, V., Bellipanni, G., Waring, R., Balciunas, D. 2016. Internal epitope tagging informed by relative lack of sequence conservation. *Sci. Rep.* 6: 36986.
- Craig MP, Grajevskaja V, Liao HK, Balciuniene J, Ekker SC, Park JS, Essner JJ, Balciunas D, Sumanas S. 2015. Etv2 and fli1b function together as key regulators of vasculogenesis and angiogenesis. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.* 35(4):865-76.
- Grajevskaja V, Balciuniene J, Balciunas D. Chicken β -globin insulators fail to shield the nkx2.5 promoter from integration site effects in zebrafish. 2013. *Molecular Genet. and Genomics.* 288(12):717-25.

Dalyvavimas Mokslinėse Konferencijose

Žodiniai pranešimai:

- Society for Developmental Biology Mid-Atlantic Regional Meeting (Baltimore, MD, USA, May 30-31, 2014)
- Mid-Atlantic Regional Zebrafish Meeting (Baltimore, MD, USA, December 13, 2013)

Stendiniai pranešimai:

- Mid-Atlantic Regional Zebrafish Meeting (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, USA, July 17, 2015)
- Mid-Atlantic Society for Developmental Biology Meeting (Princeton University, Princeton, USA, July 27, 2015)
- Society for Developmental Biology 73rd Annual Meeting (University of Washington, Seattle, Washington, USA, July 17-21, 2014)

The 2nd Annual TIME (Temple University Institute for Regenerative Medicine and Engineering) Symposium (Temple University, Philadelphia, USA, April 30, 2014)

The 1st Annual TIME (Temple University Institute for Regenerative Medicine and Engineering) Symposium (Temple University, Philadelphia, USA, 2013)

The 10th International Conference of Zebrafish Development and Genetics (Madison, Wisconsin, USA, June 20-24, 2012)

Santrauka (Anglų kalba)

In the last two decades zebrafish became an important model system to study cellular and molecular events underlying normal formation of the vertebrate heart. Zebrafish embryos provide a unique combination of advantages (*ex utero* development, large number of progeny, optical transparency of embryos, ability of embryos to obtain oxygen by a mean of passive diffusion and survive for some time in the absence of functional heart) that are important for an investigation of cardiogenesis process.

Zebrafish heart development proceeds extremely fast. At 20 hours post fertilization (hpf) individual cardiomyocytes begin to contract, and at 22 hpf the regular heart beating is observed. The blood circulation is being detected from 24 hpf. Importantly, at 2 days post fertilization (dpf) zebrafish developing heart is comparable to 12 days *post coitum* (dpc) mouse embryonic heart as well as 35 days human embryonic heart.

For a long time heart regeneration studies were limited due to the lack of a good model system. In 2002, Poss and colleagues have demonstrated that zebrafish is able to regenerate a partially amputated ventricle. However, the lack of adult zebrafish conditional mutants still remains an important disadvantage of the system, and complicates the analysis of a function of the developmentally essential genes during regeneration.

The main goal of this research project was to investigate heart regeneration mechanisms using an insertional *tbx5a*^{tp158} allele that was expected to be fully conditional, and use it to test a role of *tbx5a* during zebrafish heart regeneration. The *tp158* mutation was previously generated in dr. Balčiūnas laboratory via random integration of a Gal4-based genetrap, Switchblade 1, into the second intron of *tbx5a* gene. As a result, Tbx5a protein in *tbx5a*^{tp158} mutants is truncated after first 48 amino acids and fused with Gal4-VP16. Since the protein produced lacks a conserved T-box DNA binding domain, *tbx5a*^{tp158} is expected to be a null allele.

Tbx5 is one of the earliest cardiac transcription factors, and is essential for proper development of the heart and upper limbs in vertebrates. In humans, mutations in *TBX5* result in an autosomal dominant disorder, Holt-Oram Syndrom. A phenotypic analysis of *tbx5a*^{tp158} line revealed that *tbx5a*^{tp158/+} exhibit fully penetrant haploinsufficient phenotype. Embryos have reduced pectoral fins, while adults lack pectoral fins and display morphological heart defects such as an enlarged atrium and misshaped ventricle. According to the genotyping results, *tbx5a*^{tp158/tp158} show fully penetrant lethal phenotype. All embryos have linear heart, lack pectoral fins, and die at 6 – 7 dpf. Importantly, it was found that *tp158* mutation can be partially rescued by *tbx5a* BAC.

Several recent *in vitro* and *in vivo* studies published suggest that *tbx5a* may also be a key player during zebrafish heart regeneration. At the beginning of the project it was uncovered that *tbx5a*^{tp158/+} adults fail to regenerate a partially amputated ventricle. However, it was not clear if the observed phenotype is a direct or indirect consequence of *tbx5a* deficiency. Therefore, a conditional system was established. First, a mutagenic cassette in *tbx5a*^{tp158} line was successfully reverted with Flp^o recombinase. Second, a heart-specific CreER^{T2} driver for conditional re-mutation of *tbx5a*^{tp158} locus specifically in the cardiac tissue was used.

In order to create an early heart-specific CreER^{T2} driver, two genomic regions upstream of *nkx2.5* gene were tested. It was found that both -3.3*nkx2.5* and -6.1*nkx2.5* fragments contain heart-specific enhancers. However, none of the regions tested exhibited mRFP expression restricted to the heart. Therefore, an alternative CreER^{T2} driver, *tnnt2a:CreER^{T2}*, previously generated in dr. Balčiūnas laboratory, was tested for specificity.

Since *tnnt2a:CreER^{T2}* line was found to be a strong and non-leaky heart-specific CreER^{T2} driver, it was used to establish *tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}* and *tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* lines. Upon treatment of *tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}* embryos with 4-HT, the *tbx5a^{tp158R}* locus was successfully re-mutated specifically in the embryonic heart. Similarly, an incubation of *tbx5a^{tp158R/+};tnnt2a:CreER^{T2}* and *tbx5a^{tp158R/tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* adults in 4-HT solution resulted in a re-mutation of *tbx5a^{tp158R}* locus specifically in the adult heart. Importantly, the first conditional induction of a loss of function mutation in the adult zebrafish was demonstrated.

Cardiac regeneration experiments performed in *tbx5a^{tp158R};tnnt2a:CreER^{T2}* conditional mutants revealed that *tbx5a* is critical for normal regeneration of partially amputated zebrafish ventricle. It was found that hearts mosaic for *tbx5a^{tp158R/+}* and *tbx5a^{tp158/+}* cardiac cells undergo normal development, but show regeneration defects varying from minor collagen deposition to severe scar formation. Meanwhile, hearts mosaic for *tbx5a^{tp158R/tp158R}*, *tbx5a^{tp158R/tp158}*, and *tbx5a^{tp158/tp158}* cardiomyocytes exhibit severe regeneration phenotypes such as a significant scar and misshaped ventricle.

Genes mutated in six new insertional genetrap mutant lines were identified. The gene trap integrations were detected in six different genes: *fli1b*, *pdlim7*, *smndc1*, *ENSDART00000112671*, *ENSDART00000114996*, and *ENSDART00000111400*. One of the identified gene trap lines (*fli1b^{tp150}*) that has a mutation in *fli1b* gene was found to undergo normal regeneration of vascular system. Interestingly, the observed regrowth proceeded unevenly, but, finally, the regenerated tail

appeared normal. Importantly, the fact that GFP driven by a gene trapped *fli1b*^{tpl50} allele was overexpressed in the blood vessels and some circulating cells at 7 dpa suggests that *fli1b* might be important for regeneration of vascular system, but it's role is most likely compensated by it's paralog *fli1a*.

Trumpos žinios apie disertantę

Gimimo data ir vieta:

1985 m. lapkričio 3d., Vilnius

Išsilavinimas:

Vilniaus universitetas

Biologijos magistro kvalifikacinis laipsnis, Zoologijos programa 2008-2010

Vilniaus universitetas

Biologijos bakalauro kvalifikacinis laipsnis, Biologijos programa 2004-2008

Mokslinė veikla:

Mokslo darbuotoja, Temple universitetas 2016-dabar

zCustos baltymo vaidmens tyrimai kanoniniame Wnt signalinimo kelyje ankstyvojo *D. rerio* vystymosi metu

Daktaro disertacijos rengimas, Vilniaus universitetas, Temple universitetas 2010-2016

Danio rerio (Hamilton, 1822) širdies ir kraujagyslių sistemos vystymosi bei regeneracinių mechanizmų tyrimai

Mokslinė stažuotė, Temple universitetas 2010-2011

Danio rerio insercinių mutantų charakterizavimas

Magistro baigiamasis darbas, Vilniaus universitetas 2008-2010

Arion subfuscus/fuscus šliužų morfologinis, ekologinis ir kariologinis
palyginimas Lietuvoje ir Jungtinėse Amerikos Valstijose

Bakalauro baigiamasis darbas, Vilniaus universitetas 2006-2008

Arion ater ir *Arion rufus* taksonominė ir kariologinė analizė