

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marina Horvat

**Djelovanje membranskog transportera Oct1
u embrijima zebrice (*Danio rerio*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Marina Horvat

**Function of membrane transporter Oct1 in
zebrafish embryos (*Danio rerio*)**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Ivana Mihaljevića, te neposrednim voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Inge Urlić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Djelovanje membranskog transportera Oct1 u embrijima zebrice

(*Danio rerio*)

Marina Horvat

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Membranski transporteri ključni su za održavanje homeostaze i normalnog metabolizma, posebice u vrijeme ranog razvoja organizma. Transporteri organskih kationa (OCT, eng. *Organic Cation Transporter*), pripadnici superporodice SLC (eng. *Solute Carrier*), većinom su lokalizirani na membranama stanica bubrega i jetre, organima ključnim za biotransformaciju i izlučivanje ksenobiotika. Cilj ovog rada bio je istražiti djelovanje membranskih transportera embrija i ličinki zebrice (*Danio rerio*), s naglaskom na membranski transporter Oct1 iz porodice Slc22. Uz zebrice divljeg tipa, korištene su i one deficitantne za transporter Oct1, dobivene uspostavljenjem i genotipizacijom generacijskih linija genetski modificiranih mutanata. Praćenjem akumulacije fluorescentnih spojeva u zebricama *in vivo* pratilo se djelovanje membranskih transportera – unos u organizam, akumulacija u organima te izbacivanje u vanjski okoliš, a korištenjem supstrata transportera Oct1 pratilo se njegovo djelovanje. Uz te metode *in vivo*, djelovanje transportera Oct1 istraženo je i imunofluorescencijskim analizama unutarstanične i tkivne ekspresije *in vitro* te analizom ekspresijskih profila membranskih transportera zebrica po embrionalnim i ličinačkim stadijima *in silico*. Korištenjem zebrice tijekom ovih istraživanja pokazane su i njezine prednosti kao modelnog organizma kralježnjaka za genetička i ekotoksikološka istraživanja.

(96 stranica, 33 slike, 5 tablica, 141 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: membranski transporteri, Oct1, zebrica, metabolizam, fluorescentne boje

Voditelj: dr. sc. Ivan Mihaljević

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenitelji:

izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

doc. dr. sc. Ivana Šola

doc. dr. sc. Marin Ježić

doc. dr. sc. Romana Gračan (zamjena)

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Function of membrane transporter Oct1 in zebrafish embryos (*Danio rerio*)

Marina Horvat

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Membrane transporters are crucial for maintaining homeostasis and metabolism, especially during the early development of an organism. Organic Cation Transporters (OCTs), members of the Solute Carrier (SLC) superfamily, are mostly localized on the cell membranes of kidney and liver, organs crucial for biotransformation and xenobiotic secretion. The aim of this study was to investigate the activity of membrane transporters of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae, with emphasis on the membrane transporter Oct1, member of the Slc22 family. In addition to wild-type zebrafish, those deficient for the Oct1 transporter, obtained by establishing and genotyping generation lines of genetically modified mutants, were also used. The activity of membrane transporters was observed by *in vivo* monitoring of the accumulation of fluorescent compounds in zebrafish – their uptake into the organism, accumulation in organs and excretion into the environment – and the activity of Oct1 transporter was monitored by using its substrates. In addition to these *in vivo* methods, the activity of the Oct1 transporter was investigated also by *in vitro* immunofluorescence analyzes of intracellular and tissue expression, and *in silico* analysis of the expression profiles of membrane transporters by embryonic and larval stages. Using zebrafish throughout all experiments, benefits of zebrafish as a model vertebrate organism for genetic and ecotoxicological research have been demonstrated.

(96 pages, 33 figures, 5 tables, 141 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: membrane transporters, Oct1, zebrafish, metabolism, fluorescent dyes

Supervisor: Dr. Ivan Mihaljević

Co-supervisor: Assoc. Prof. Inga Urlić

Reviewers:

Assoc. Prof. Inga Urlić

Asst. Prof. Ivana Šola

Asst. Prof. Marin Ježić

Asst. Prof. Romana Gračan (substitute)

Thesis accepted:

Najveću zahvalu dugujem svom voditelju dr. sc. Ivanu Mihaljeviću na pruženoj prilici, stručnom vodstvu i savjetima te brizi oko izrade ovog rada, kako u laboratoriju, tako i tijekom godišnjih odmora.

Također se zahvaljujem ostalim djelatnicima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković, posebice Jeleni za sve savjete i demonstracije eksperimenata, Jovici za svo eksperimentalno iskustvo izvan okvira ovog rada, Tvrtku za trud i vrijeme uloženo u davanje brojnih komentara te Marti za njezinu preporuku bez koje ne bih imala priliku raditi sa tim divnim ljudima. Naravno, posebno veliko hvala ide Lani, partnerici za mikroskopiranje, rezanje repića i premještanje stakalaca, bez koje bih ovo iskustvo završila s puno manje dobrih slika, kolača i osmijeha.

Zahvaljujem se i dr. sc. Deanu Karaici iz Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada za lijepu suradnju, brojne savjete i preneseno znanje, kao i prilici da upoznam njegov laboratorij.

Hvala i suvoditeljici izv. prof. dr. sc. Ingi Urlić na konkretnim komentarima i zanimanju za ovaj rad.

Hvala svim mojim dragim prijateljima, novim i starim, koji su mi uljepšali i upotpunili ove studentske dane.

Na kraju, hvala mojoj mami, tati, bratu i baki bez kojih ne bi bilo svih ovih lijepih trenutaka.

Hvala za sve.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. ADME procesi.....	2
1.2. Superporodice membranskih transportera.....	3
1.3. Membranski transporteri porodice SLC22.....	4
1.4. Transporteri organskih kationa.....	5
1.4.1. Transporteri OCT.....	6
1.4.2. Tkivna distribucija ljudskih transportera OCT.....	6
1.5. Zebrica kao modelni organizam.....	7
1.6. Embriogeneza i organogeneza zebrice.....	8
1.7. Razvoj glavnih metaboličkih organa zebrice.....	9
1.7.1. Razvoj bubrega zebrice.....	9
1.7.2. Razvoj jetre zebrice.....	10
1.8. Fluorescentne boje.....	12
1.8.1. ASP+.....	12
1.8.2. Berberin.....	12
1.8.3. Rodamini.....	13
1.8.4. Lucifer žuto.....	13
1.8.5. Fluoresceini.....	13
1.8.6. Kalcein AM.....	14
1.9. Cilj istraživanja.....	14
2. MATERIJALI I METODE	16
2.1. Materijali.....	17
2.2. Metode.....	21
2.2.1. Uzgoj zebrica i mrijest.....	21
2.2.2. Genotipizacija F1 i F2 generacije zebrica mutanata za protein Oct1.....	21
2.2.3. Praćenje akumulacije fluorescentnih boja u embrijima zebrice <i>in vivo</i>	28
2.2.4. Priprema kriopreparata embrija zebrice.....	30
2.2.5. Imunofluorescencijske metode.....	31
2.2.6. Ekspresijski profili membranskih transportera zebrice po embrionalnim i ličinačkim stadijima.....	35

3. REZULTATI	37
3.1. Genotipizacija F1 i F2 generacije zebrica mutanata za protein Oct1	38
3.2. Praćenje akumulacije fluorescentnih boja u embrijima zebrice <i>in vivo</i>	40
3.2.1. Inkubacija embrija zebrice divljeg tipa fluorescentnim bojama	40
3.2.2. Inkubacija embrija zebrice genotipa Oct1 KO fluorescentnim bojama	57
3.2.3. Mikroinjektiranje žumanjčane vreće embrija zebrice fluorescentnim bojama	58
3.3. Imunofluorescencijske metode	60
3.3.1. Unutarstanična lokalizacija membranskog transportera Oct1	60
3.3.2. Tkivna lokalizacija membranskog transportera Oct1 u ličinkama zebrice	61
3.4. Ekspresijski profili membranskih transportera zebrice po embrionalnim i ličinačkim stadijima.....	63
4. RASPRAVA	65
4.1. Genotipizacija F1 i F2 generacije zebrica mutanata za protein Oct1	66
4.2. Praćenje akumulacije fluorescentnih boja u embrijima zebrica <i>in vivo</i>	67
4.3. Imunofluorescencijske metode za otkrivanje unutarstanične i tkivne lokalizacije proteina Oct1 u ličinkama zebrice	75
5. ZAKLJUČAK	78
6. LITERATURA	80
7. ŽIVOTOPIS	95

1. UVOD

1.1. ADME procesi

U svom prirodnom okolišu organizmi su kontinuirano izloženi raznim ksenobioticima, tvarima koje su strane normalnom metabolizmu. Kako bi se zaštitili od tih spojeva, ali i od nekih endobiotika (potencijalno štetnih tvari normalo prisutnih u organizmu), u stanicama postoji koordinirano djelovanje proteina transportera, kanala, receptora i enzima koji predstavljaju prvi stanični sustav obrane (Ekins i sur. 2005). Oni su samo jedna od raznih prepreka s kojima se molekula susreće na putu do svog ciljnog mjesta, u tijeku procesa apsorpcije, distribucije po tijelu, metabolizma i ekskrecije/izlučivanja (engl. ADME procesi: *Absorption*, *Distribution*, *Metabolism*, *Excretion*).

Procesima apsorpcije ksenobiotik ulazi u sistemsku cirkulaciju organizma. Bez obzira na mjesto apsorpcije (koža, respiratorni trakt ili, najčešće, gastrointestinalni trakt) ksenobiotici moraju prijeći staničnu membranu kako bi ušli u krvotok. Male, lipofilne molekule mogu prijeći lipidne membrane pasivnom difuzijom niz svoj koncentracijski gradijent ili olakšanom difuzijom putem transportera. Veliki, visoko polarni ili nabijeni spojevi ne mogu ih proći difuzijom te dakle ovise o prisutnosti aktivnih transportnih mehanizama posredovanih transportnim proteinima.

Spojevi koji uđu u epitelne stanice crijeva mogu preko njih ući i u krvotok. Međutim, hidrofobni spojevi ne otapaju se u krvi. Transportni serumski proteini vežu takve proteine i prenose ih krvotokom, gdje se oni redistribuiraju u različita tkiva i organe. Osim o vezanju na proteine u krvi, distribucija spojeva ovisi i o funkcionalnom stanju tkiva, mogućnosti pasivne difuzije kroz membrane te prisutnosti aktivnih transportera (Caldwell i sur. 1995).

Zadnji izazov ksenobiotika je izbjeći obranu organizma od stranih tvari. Organizmi su opremljeni detoksikacijskim mehanizmima metabolizirajućih enzima i transportera koji posreduju u njihovoj inaktivaciji i izlučivanju (Jonker i Schinkel 2004). Dva najčešća procesa metabolizma ksenobiotika su oksidacija (transformacija faze I) i konjugacija (transformacija faze II). Te biotransformacije odvijaju se gotovo u svim organima i tkivima, ali najvažnija među njima je jetra, zbog visoke razine ekspresije detoksikacijskih enzima (Franklin 2014). Ti enzimski sustavi uključuju enzime faze I unutar superporodice CYP (citokromi P450), i enzime faze II kao što su GST (glutathion S-transferaza) i UGT (uridin difosfat glukuronil transferaza). Cilj tih reakcija je povećanje topivosti spoja za omogućavanje njegovog izbacivanja iz stanice u fazi III metabolizma,

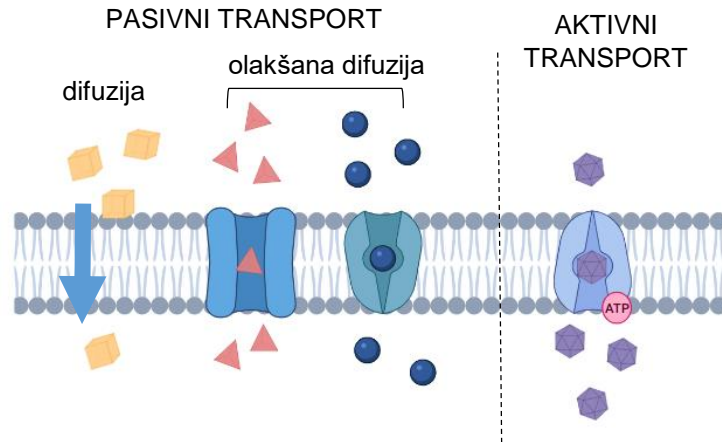
putem membranskih transportera porodice MRP (engl. *Multidrug Resistance Protein*) (Váradi i Sarkadi 2003).

Nakon što spojevi ponovno uđu u krvotok, mogu biti uklonjeni iz cirkulacije i izlučeni iz tijela na jedan od dva načina. Prvo, mogu biti absorbirani kroz bubrege i izlučeni u urin, ili mogu biti aktivno prebačeni u žuč pa izlučeni u krv, izbačeni u okoliš kroz probavni sustav ili degradirani probavnim enzimima (Berg i sur. 2001).

1.2. Superporodice membranskih transportera

Skoro na svakoj membrani stanica su prisutni transporteri (prijenosnici). Transporteri važni za uklanjanje ksenobiotika i štetnih produkata metabolizma općenito su prisutni u glavnim organima za izlučivanje: jetri, bubrezima i crijevima, a posebice su bitne dvije grupe transportera, tzv. *uptake* i *efflux* transporteri, tj. transporteri za unošenje i izbacivanje molekula iz stanice.

Superporodica transportera SLC (engl. *Solute Carrier*) pripada najvećoj poznatoj superporodici sekundarnih transportera MSF (engl. *Major Facilitator Superfamily*), čija je distribucija sveprisutna u svim trenutno poznatim filogenetskim skupinama organizama (Reddy i sur. 2012). Većina transportera SLC su *uptake* transporteri. Oni posreduju kretanju otopljenih tvari iz izvanstaničnog prostora u stanice (Slika 1), pasivnom difuzijom, kotransportom niz koncentracijski gradijent (simport) ili kontra-transportom uz koncentracijski gradijent (antiport). Taj sekundarni aktivni transport omogućen je protonskim gradijentom dobivenim hidrolizom ATP-a. Ona je pokretačka snaga i transporta superporodice *efflux* transportera ABC (engl. *ATP-binding Cassette Transporters*) koji izbacuju molekule iz stanice. *Efflux* transporterima pripadaju i H⁺/organski kation antiporteri porodice MATE (engl. *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) koja pripada porodici SLC47 (Liu i Pan 2019).



Slika 1. Glavni tipovi transporta tvari kroz staničnu membranu.

Stoga, uzajamno djelovanje *uptake* i *efflux* transportera potrebno je za prijenos tvari kroz bazolateralnu i apikalnu membranu stanice. Regulacijom apsorpcije putem *uptake* transportera te izbacivanjem spojeva iz stanica putem *efflux* transportera organizam se brani od prekomjernog nakupljanja i toksičnog učinka pojedinih spojeva te se omogućava njihovo uklanjanje iz cirkulacije, odnosno ekskrecija iz organizma (Nies i sur. 2011).

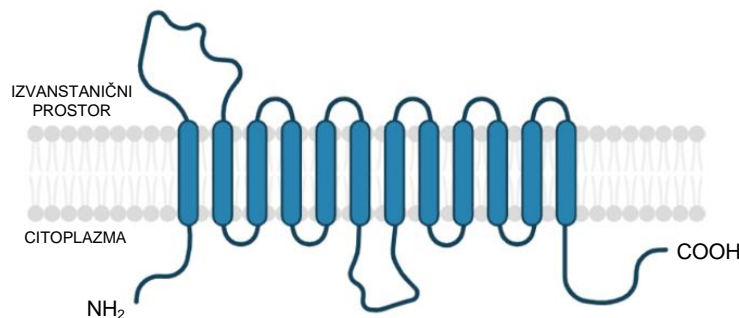
1.3. Membranski transporteri porodice SLC22

Većina membranskih transportera je oligospecifična, tj. specijalizirana za translokaciju jednog glavnog supstrata i molekula vrlo slične strukture (Ciarimboli i Schlatter 2005). S druge strane, polispecifični transporteri prenose spojeve širokog raspona mase i strukture. Takvi transporteri mogu pokazivati velike varijacije u afinitetu i stopi transporta za različite spojeve te mogu imati specifične fiziološke uloge (Koepsell i sur. 2007).

Porodica SLC22 (nomenklatura SLC22 kod ljudi, Slc22 kod drugih organizama) sastoji se od 13 funkcionalno okarakteriziranih polispecifičnih transportera podijeljenih u nekoliko potporodica organiziranih u tri skupine, ovisno o funkcionalnim svojstvima i specifičnosti supstrata: (1) transporteri organskih kationa (OCT, engl. *Organic Cation Transporter*, geni SLC22A1-3), (2) transporteri organskih aniona (OAT, engl. *Organic Anion Transporter*, geni SLC22A6-20) i (3) transporteri organskih kationa/karnitina (OCTN, engl. *Organic Cation/Carnitine Transporter*, geni SLC22A4-5) (Mihaljević i sur. 2016). Filogenetskom analizom

pokazano je da je porodica SLC22 evoluirala prije više od 450 milijuna godina (Zhu i sur. 2015). Kod ljudi postoji 23 gena SLC22, a broj identificiranih gena ostalih vrsta kralježnjaka je promjenjiv i specifičan za vrstu.

Struktura većine članova sastoji se od 12 α -spiralnih transmembranskih domena (TMD, engl. *transmembrane domain*), velike glikozilirane izvanstanične petlje između 1. i 2. TMD-e sa šest tiolnih skupina za stvaranje disulfidnih mostova, velike unutarstanične petlje s mjestima za fosforilaciju između 6. i 7. TMD-e te unutarstaničnog NH₂- i COOH- kraja (Slika 2). Disulfidni mostovi i posttranslacijske modifikacije stabiliziraju terciarnu strukturu petlje što je važno za oligomerizaciju monomera (Koepsell 2015), a to je važno za transport proteina od endoplazmatskog retikuluma do stanične membrane (Brast i sur. 2012).



Slika 2. Shema strukture membranskog transportera OCT1. Ima 12 TMD-a, glikoziliranu izvanstaničnu petlju između 1. i 2. TMD-e, veliku unutarstaničnu petlju između 6. i 7. TMD-e te unutarstanične NH₂- i COOH- krajeve.

1.4. Transporteri organskih kationa

Organski kationi su organske molekule s prolaznim ili trajnim pozitivnim nabojem. To su brojni fiziološki važni endogeni spojevi poput monoaminskih neurotransmitera, kolina i koenzima, ali također i brojni lijekovi poput prokainamida, kinina i cimetidina (Ciarimboli i Schlatter 2005), te ksenobiotici. Budući da lipidni dvosloj nije propusan za većinu organskih kationa, njihova crijevna apsorpcija, raspodjela po tkivima i izlučivanje iz tijela ovisi o membranskim transporterima (Roth i sur. 2012).

Porodica SLC22 sadrži tri podvrste transportera organskih kationa: elektrogeni prijenosnici organskih kationa (OCT1, SLC22A1; OCT2, SLC22A2; i OCT3, SLC22A3), elektroneutralni

prijenosnici organskih kationa (OCTN1, SLC22A4; OCTN2, SLC22A5; i OCTN3, SLC22A6), te karnitinski/kationski transporter OCT6 (SLC22A16) (Liu i Pan 2019).

1.4.1. Transporteri OCT

Geni transportera OCT (nomenklatura OCT1 kod ljudi i glodavaca, Oct1 kod drugih organizama) su visoko očuvani u vrstama kralježnjaka. Sličnost aminokiselinskih slijedova između ljudskih proteina OCT1 i OCT2 je 70%, između OCT1 i OCT3 te OCT2 i OCT3 50%, a relativna molekularna masa im je 62 kDa. Imaju 11 egzona i 10 introna (Nies i sur. 2011). Predstavljani su s tri koortologa u gmazova, ptica i ljudi, dok kod riba koštunjača i vodozemaca postoji dva, odnosno jedan ortolog (Mihaljević i sur. 2016). Aktivno mjesto sastoji se od osam aminokiselina koje definiraju afinitet supstrata i transportni mehanizam. Transportna aktivnost regulirana je i posttranslacijskim modifikacijama na izvanstaničnoj (glikozilacija) i unutarstaničnoj (fosforilacija) petlji. Transport je elektrogen, ovisan o naponu i dvosmjernan, ali neovisan o pH i koncentraciji Na⁺ iona (Ciarimboli i Schlatter 2005).

Većina supstrata koje translociraju transporteri OCT su organski kationi i slabe baze koje su pozitivno nabijene pri fiziološkom pH, ali se mogu transportirati i nenabijeni spojevi (Koepsell i sur. 2007). Tipični OCT supstrati su kationski modelni spojevi: 1-metil-4-fenilpiridinij (MPP⁺), tetraetilamonij (TEA), 4-[4-(dimetilamino)-stiril]-N-metilpiridinij (ASP⁺) i 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Međutim, OCT transportira i endogene spojeve poput neurotransmitera i metabolita kolina, putrescina i agmatina, brojnih lijekova kao što su metformin, aciklovir, berberin, i ksenobiotike poput aflatoksina B1 i etidij bromida (Mihaljević i sur. 2016). Iako su mnogi supstrati i inhibitori zajednički za sva tri OCT transportera, postoje razlike u specifičnosti između pojedinih podtipova transportera i između podtipova transportera različitih vrsta (Koepsell i sur. 2007).

1.4.2. Tkivna distribucija ljudskih transportera OCT

Ljudski transporter OCT1 je najviše eksprimiran u jetri, na sinusoidnim membranama hepatocita te se smatra specifičnim prijenosnikom jetre, zajedno s anionskim transporterima OATP1B1 i OATP1B3. Manju ekspresiju ima na apikalnim mebranama stanica proksimalnih i

distalnih tubula nefrona, luminalnim membranama epitelnih stanica dušnika i bronha, kao i u neuronima (Jonker i Schinkel 2004). Također, malu ekspresiju ima i u drugim tkivima, poput srca, koštanih mišića i posteljice (Gorboulev i sur. 1997).

Ljudski transporter OCT2 ima ograničeniji obrazac ekspresije. Najviše je eksprimiran u bubregu, na bazolateralnim membranama epitelnih stanica sva tri segmenta proksimalnog tubula (Motohashi i sur. 2002). Prisutan je i na bazolateralnim membranama tankog crijeva (Gorboulev i sur. 1997), luminalnoj membrani dušnika i epitelnih stanica bronha (Lips i sur. 2005). Malu ekspresiju ima i na luminalnoj membrani endotelnih stanica malih žila te na apikalnoj membrani epitelnih stanica koroidnog plekususa (Jonker i Schinkel 2004).

Za razliku od OCT1 i OCT2, koji su pretežno izraženi u glavnim ekskretornim organima, ekspresija transportera OCT3 u njima je vrlo mala. Tkivna distribucija mu je raširenija – prisutan je na bazalnoj membrani trofoblasta posteljice, apikalnoj membrani enterocita i luminalnoj membrani epitelnih stanica pluća (Roth i sur. 2012), kao i u mišićima i glija stanicama (Inazu i sur. 2003; Chen i sur. 2010).

1.5. Zebrica kao modelni organizam

Riba zebrica (*Danio rerio* F. Hamilton, 1822) je slatkovodna riba porijeklom iz plitkih i mirnih rijeka Južne Azije. Pripada porodici Cyprinidae (šarani) i redu Cypriniformes (Wei 2018). Kao laboratorijska životinja počela se koristiti 1930-ih godina, prvenstveno za proučavanje učinaka toksina i alkohola zbog mogućnosti jednostavnog dodavanja spojeva u vodu (Goessling i Sadler 2015). Prve korake prema uspostavljanju zebrice kao važnog modela za proučavanje razvoja kralježnjaka putem molekularnih metoda napravio je 1972. godine George Streisinger. Tražeći kralježnjake za proučavanje ranog razvoja, odabrao je zebricu koja ima tri važne kvalitete: velik broj potomaka dostupnih u najranijim fazama razvoja, prozirnost i diploidni genom (Houart 2001). Dovoljno je mala da je moguće provesti genetske studije na velikom broju organizama, ali je dovoljno velika za izvršavanje klasičnih embrioloških manipulacija poput transplantacija. Tako je u posljednjih tridesetak godina zebrica postala jedan od najvažnijih organizama za biološka i biomedicinska istraživanja. Male je veličine (do 5 cm od glave do početka repne peraje), što omogućava održavanje relativno velikog broja riba u malom prostoru. Također, ima kratko

generativno vrijeme (2 – 3 mjeseca) i velik broj potomaka (Xu i Zon 2010). Embriji su prozirni, a upotrebom specifičnih spojeva ili genetičkih mutanata to mogu biti i odrasle jedinke (Karlsson i sur. 2001; White i sur. 2007).

1.6. Embriogeneza i organogeneza zebrice

Embriji zebrice nastaju vanjskom oplodnjom i svoj razvitak nastavljaju izvan tijela ženke. Razvitak ide vrlo brzo – već 24 sata nakon oplodnje (engl. *hours post fertilization*, hpf) embrio formira većinu svojih tkiva i primordija organa uključujući živčani sustav i kontrahirajuću srčanu cijev (Poon i Brand 2003). Korion, troslojna ovojnica oko embrija, počinje se razgrađivati proteolitičkim enzimima 48 ili 72 hpf (Kim i sur. 2006). Prema dogovoru, embrio postaje ličinka 72 hpf bez obzira je li se izlegao ili nije (Kimmel i sur. 1995).

Napuhivanje plivaćeg mjehura počinje nedugo nakon i ličinka se počinje kretati u stupcu vode (Parichy i sur. 2009). Probavni sustav zebrice sastoji se od tri segmenata: prednjeg zadebljanja te srednjeg i stražnjeg crijeva. Lumen crijeva nastaje 60 hpf, a 76 hpf enteroendokrine stanice počinju lučiti hormone. Četvrtog dana crijevo zebrice pokazuje spontane, koordinirane kontrakcije, a jedan dan kasnije većina probavnog sustava postaje funkcionalna (Flores i sur. 2020). Organogeneza je u velikoj mjeri potpuna pet dana nakon oplodnje (engl. *days post fertilization*, dpf) kada se na početku probavnog sustava razvijaju usta i ličinka se može sama aktivno hraniti (Carpio i Estrada 2006). Ličinka je do 30. dana, kada prolazi kroz metamorfozu i postaje mlada riba. S tri do četiri mjeseca postaje spolno zrela te riba postaje odrasla (Ali i sur. 2011). Ženke zebrice mogu proizvesti 200 jajašca tjedno, tijekom cijele godine. To znači da s prosječnim životnim vijekom između dvije i četiri godine, jedna ženka može tijekom svog života proizvesti čak do 35 000 jajašca (Dahm i Geisler 2006).

1.7. Razvoj glavnih metaboličkih organa zebrice

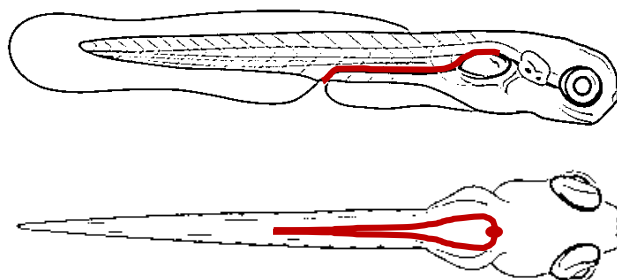
1.7.1. Razvoj bubrega zebrice

Bubreg ima dvije glavne funkcije: uklanjanje otpadnih tvari iz krvi i održavanje koncentracije iona i metabolita u krvi unutar fizioloških raspona koji podržavaju pravilan rad svih drugih stanica. Bubrežna funkcija se uglavnom postiže prvo filtriranjem krvi, a zatim reapsorpcijom korisnih iona i malih molekula. Taj posao obavljaju nefroni, funkcionalne jedinice bubrega (Drummond i Davidson 2016).

Tijekom evolucije kralježnjaka pojavljuju se tri bubrega sve veće složenosti: pronefros, mezonefros i metanefros. Pronefros je najprimitiviji bubreg koji se formira prvi tijekom embriogeneze. On predstavlja funkcionalni bubreg ličinki riba koštunjača i vodozemaca. Sastoji se od para nefrona s dva glomerula spojena na središnjoj liniji, ventralno od dorzalne aorte, s dva paralelna tubula koji se spajaju u području kloake (Slika 3) (Drummond i sur. 1998). Tubul je podijeljen u dva segmenta, proksimalni i distalni, koji su isto podijeljeni u dva segmenta, proksimalni zavojiti tubul i proksimalni ravni tubul te distalni rani tubul i distalni kasni tubul. Iako su strukture pronefrosa zebrice karakteristične, one su homologne segmentima nefrona sisavaca. Proksimalni tubul ima četkastu membranu i kuboidni epitel kao i proksimalni tubuli sisavaca (Drummond i Davidson 2016). Distalni rani tubul zebrice homologan je debelom uzlaznom tubulu sisavaca, a distalni kasni segment reprezentativan je distalnim zavojitim tubulima. Međutim, nedostaju im tanki segmenti koji olakšavaju koncentriranje urina (Outtandy i sur. 2019).

Pronefrični bubreg nastaje postupno i brzo. Oko 24 hpf se formiraju tubuli s apikalnom i bazolateralnom membranom sa svojim membranskim transporterima. Nastanak glomerula i početak glomerularne filtracije se zbiva između 40 i 48 hpf, ali kroz njega mogu proći i velike molekule, a potpuno sazrijevanje i selektivnost pora nastupa 4 dpf (Drummond i Davidson 2016). Iako je takav embrionalni pronefros prilično jednostavne strukture, sa samo tim parom nefrona zebrica živi par tjedana prije početka stvaranja mezonefrosa, bubrega odraslih riba i vodozemaca. Nakon dva tjedna i rasta ličinke za 4-5 mm, dolazi do dodatka tubula iste strukture u već postojeće tubule pronefrosa, do nastanka nekoliko stotina nefrona te strukture mezonefrosa. Međutim, nikad ne stvaraju treći, metanefrični bubreg kao odrasle ptice i sisavci. Zanimljivo je da odrasle zebrice imaju svojstvo neonefrogeneze, nastanka novih nefrona iz nakupina bubrežnih progenitornih stanica kako riba

raste u veličinu ili zadobije oštećenje bubrega. Viši kralježnjaci ne posjeduju tu osobinu (Gerlach i Wingert 2013).



Slika 3. Shema bubrega ličinke zebrice 5 dpf.

Ključni posrednici eliminacije i apsorpcije tvari iz bubrega su membranski transporteri lokalizirani u bazolateralnoj i apikalnoj membrani tubula. S obzirom na način života i okoliš, ekspresija i lokalizacija membranskih transportera se razlikuju po skupinama organizama. U bubrezima zebrice dominiraju Slc22 transporteri Oct1 i Oat3 s vrlo visokom ekspresijom, Oat2c, Oat2e, Octn2 i Oat10 s visokom ekspresijom te umjereno eksprimirani Oct2 i Oct6 (Popović 2014; Mihaljević i sur. 2017).

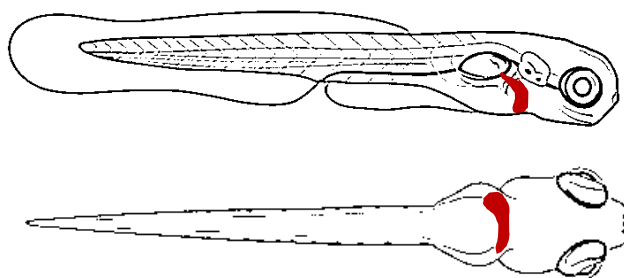
1.7.2. Razvoj jetre zebrice

Jetra je jedan od najvećih unutarnjih organa u tijelu kralježnjaka. Većinu stanica jetre čine hepatociti koji ostvaruju većinu funkcija jetre: metabolizam širokog raspona endogenih i egzogenih tvari, sinteza krvnih proteina i faktora zgrušavanja, skladištenje glikogena, aminokiselina, masti i željeza, kao i izlučivanje žuči (Tao i Peng 2009).

Zebrice imaju jedinstvenu jetrenu anatomiju i staničnu arhitekturu. Jetra im je organizirana u tri režnja, dva bočna i jedan trbušni, ali joj nedostaju portalni traktovi koji razdvajaju režnjeve u jetri sisavaca (Goessling i Sadler 2015). Umjesto toga, žučni kanali portalne vene i hepatične arterije nasumično su raspoređeni po cijeloj jetri. Hepatociti sisavaca su raspoređeni u pločama, dok su u jetri zebrice raspoređeni u tubulima koji zatvaraju male žučne kanale (Vliegenthart i sur. 2014). Ribe imaju dvije vrste bilijarnih (žučnih) stanica: male preduktalne bilijarne epitelne stanice, koje stvaraju unutarstanične lumene za transport žuči iz hepatocita, i veće stupaste stanice, koje tvore žučne kanaliće (Goessling i Sadler 2015). Žučni kanalići izlaze centripetalno između

hepatocita do anastomoza, spleta žila s jednom duktularnom stanicom, tvoreći duktulu u središtu tubula. Ti duktuli tvore mrežu koja prenosi žuč koju izlučuju hepatociti. Nizvodno, duktuli se spajaju u intrahepatične žučne kanale te konvergiraju u cistični kanal, koji izlazi iz jetre u hilum za povezivanje sa žučnim mjehurom. Nakon toga žučni mjehur se prazni u crijevo kroz zajednički žučni kanal (Vliegenthart i sur. 2014).

Kao i ostali organi, jetra zebrice nastaje vrlo brzo, a razvija se kao izdanak prednjeg dijela crijeva. Agregacija hepatocita vidljiva je već malo nakon 24 hpf te raste i stvara glatko zadebljalo područje s lijeve strane crijevnog primordija nakon 30 hpf. Brazda između jetre i jednjaka nastaje nedugo zatim, 34 hpf. Brazda se širi na posteriornom dijelu te 50 hpf iz tih vezivnih stanica nastaje polarizirani epitel žučnog kanala i jetra postaje jasno prepoznatljiva (Field i sur. 2003). Nakon toga slijedi brza proliferacija stanica jetre i drastična promjena njene veličine, oblika i položaja. Do 72 hpf veličina jetre se umjereno povećava, bez izmjene oblika te postaje vaskularizirana, a protok krvi započinje nedugo zatim (Ober i sur. 2003). Jetra zebrice stare 96 hpf se proteže s lijeve strane tijela preko srednje linije ventralno do jednjaka, sprijeda dodirujući perikardijalnu šupljinu i preklapajući se s prednjim dijelom zaostalog žumanjka (Tao i Peng 2009). Zebrica stara 5 dpf aktivno traži hranu i rezerve žumanjčane vrećice postaju iscrpljene. Do tog vremena ličinka već ima potpuno funkcionalnu jetru (Slika 4).



Slika 4. Shema jetre ličinke zebrice 5 dpf.

Kao i membranski transporteri bubrega, ekspresija transportera jetre specifična je za određenu skupinu organizama. Od transportera Slc22, u jetri zebrice dominantnu ekspresiju imaju transporteri Oct2 te Oct1 kod mužjaka, a umjerenu ekspresiju ima kod ženki (Popović 2014; Mihaljević 2017).

1.8. Fluorescentne boje

Dobar način proučavanja transportnih procesa je putem modelnih fluorescentnih supstrata. Njihovo korištenje u svrhu praćenja transporta organskih tvari provodi se od sedamdesetih godina prošlog stoljeća kada je fluorescein korišten za analizu transporta organskih aniona u bubregu žabe (Bresler i sur. 1975). Praćenjem ulaska supstrata u stanicu moguće je odrediti biokemijska svojstva transportera, poput Michaelisove konstante (K_m) koja numerički izražava afinitet enzima prema supstratu. K_m se definira kao ona koncentracija supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine transporta. To znači da što enzim jače veže svoj supstrat, manja je vrijednost K_m . Uz poznavanje te vrijednosti, kao i valnih duljina apsorpcije i emisije pojedinih fluorescentnih spojeva, moguće je odrediti potrebnu koncentraciju boje za inkubaciju te pratiti njenu akumulaciju u stanicama ili tkivima, metodama *in vitro* ili *in vivo*. Zbog svoje male veličine i optički prozirnih embrija, zebrića je izvrsno prilagođena za ovakve metode istraživanja koje uključuju fluorescentne boje.

1.8.1. ASP+

ASP+ (4-(4-dietilaminostiril)-N-metilpiridinium jodid, 4-Di-2-ASP) je fluorescentna boja slabe fluorescencije u vodenoj otopini, koja se povećava u viskoznim medijima i nakon adsorpcije na biološke membrane (Ciarimboli i Schlatter 2016). Ekscitira se pri svjetlosti valne duljine 460 nm, a emitira svjetlost pri 600 nm (Mihaljević 2015). Nakon što uđe u stanicu, nakuplja se u mitohondrijima (Pintelon i sur 2005). pK_a vrijednost joj je 3.8, ima trajni pozitivni naboj i stabilna je u širokom rasponu pH i temperature (Ugwu i sur 2017). Također ima nisku lipofilnost i nije otrovna. Uz istraživanja transmembranskih potencijala živih stanica, bojenja mitohondrija i živčanih završetaka, idealan je supstrat za proučavanje aktivnosti transportera organskih kationa. Štoviše, poznati je supstrat transportera zebriće Oct1, s K_m vrijednosti 25.97 μ M (Mihaljević 2015).

1.8.2. Berberin

Berberin je kationski fluorescentni alkaloid izoliran iz korijenja, rizoma i kore biljaka (Sainova i sur. 2006). Koristi se u medicinske svrhe zbog svojih antitumorskih, antimikrobnih i

protuupalnih svojstava proizašlih iz sposobnosti vezanja za DNA. Zbog toga se koristi i kao fluorescentna proba za proučavanje stanica te DNA i drugih makromolekula u analitičkim i biokemijskim istraživanjima (Domingo i sur. 2010). Apsorbira svjetlost valne duljine 355 nm, a emitira svjetlost pri 540 nm. Supstrat je kationskog transportera zebrice Oct1 ($K_m = 3.96 \mu\text{M}$) (Mihaljević 2015).

1.8.3. Rodamini

Rodamini su lipofilne kationske fluorescentne boje koje se akumuliraju u mitohondrijima. Zbog toga se često koriste za procjenu bioenergetike mitohondrija u živim stanicama (Jouan i sur. 2014). Derivati rodamina imaju velike raspone apsorpcije i emisije fluorescencije, unutar narančasto-crvenog vidljivog spektra (Hermanson 2013). Zbog izvrsne fotostabilnosti koriste se kao fluorescencijski standardi i sonde u biološkim istraživanjima (Beija i sur. 2009). Poznati derivati rodamina su rodamin B (RhB), koji ima tri molekularne forme (neutralnu, kationsku i kationsko-laktonsku) (Arbeloa i Ojeda 1981) i rodamin 123 (Rh123), koji je supstrat kationskog transportera zebrice Oct1 ($K_m = 103.7 \text{ nM}$) (Mihaljević 2015).

1.8.4. Lucifer žuto

Lucifer žuto (eng. *Lucifer yellow*; LY) je mala hidrofobna molekula s jakom fluorescencijom svjetlosti na 529 nm pri ekscitaciji na 485 nm. Stabilna je unutar širokog raspona pH, pH 2-10, te nije toksična za stanice (Cardoso-Gustavson i sur. 2013). Ima nekoliko derivata, a najviše se koristi za citokemijska bojanja, osobito u neurofiziologiji (Hermanson 2013). Poznati je supstrat anionskih transportera Oat1 ($K_m = 11.4 \mu\text{M}$), Oat2a ($K_m = 122 \mu\text{M}$), Oat2d ($K_m = 49.68 \mu\text{M}$) (Dragojević i sur. 2017) te Oatp1d1 ($K_m = 41.7 \mu\text{M}$) (Popović i sur. 2013).

1.8.5. Fluoresceini

Fluorescein i njegovi derivati najčešće su korištene fluorescentne boje u biološkim istraživanjima. Dobro su topljivi u vodi i imaju relativno širok spektar apsorpcije (488-495 nm) i emisije fluorescencije (518-525 nm). Fluorescentni signal im je osjetljiv na promjene pH.

Najpopularniji derivat fluoresceina je FITC (fluorescein izotiocijanat). Iako je FITC jedna od najstarijih reaktivnih boja koja se koristi za označavanje biomolekula, još uvijek se često koristi u brojnim metodama detekcije fluorescencije (Hermanson 2013). Poznati derivati su i 2,7-diklorofluorescein (2,7-dClF), 5-karboksifluorescein (5-CF) i 6-karboksifluorescein (6-CF), koji je supstrat anionskih transportera Oat2b ($K_m = 199.7 \mu\text{M}$), Oat2d ($K_m = 266.9 \mu\text{M}$) i Oat3 ($K_m = 5.8 \mu\text{M}$) (Dragojević 2018).

1.8.6. Kalcein AM

Kalcein AM (kalcein acetoksimetil ester, Kalc-AM) je anionski hidrofobni spoj koji lako prolazi kroz membrane stanica. Nije fluorescentan, ali jednom kad uđe u stanice hidroliziraju ga citosolne esteraze i stvara se zeleni, fluorescentni spoj kalcein valne duljine pobude i emisije 490 nm, odnosno 515 nm (Fischer i sur. 2013). Koristiti se za određivanje vitalnosti stanica, ali i praćenje okoštavanja skeletnih struktura jer se specifično veže za kalcij u kostima (Du i sur. 2001).

1.9. Cilj istraživanja

Kako je transport tvari kroz membrane ključan za odražavanje homeostaze i djelovanje metabolizma, posebice u vrijeme ranog razvoja organizma, cilj ovog rada bilo je istražiti djelovanje membranskih transportera u embrijima i ličinkama zebrice. Nadalje, korištenjem zebrice pokazale su se njezine prednosti kao modelnog organizma kralježnjaka za genetička i ekotoksikološka istraživanja. Praćenjem akumulacije fluorescentnih spojeva *in vivo* istraženo je djelovanje membranskih transportera – unos u organizam, akumulacija u organima te izbacivanje u vanjski okoliš. Detaljnije je bio istražen membranski transporter porodice Slc22, Oct1, praćenjem akumulacije njegovih poznatih supstrata te imunofluorescencijskim analizama unutarstanične i tkivne ekspresije u ličinkama zebrice *in vitro*. Nakon uspostavljanja i genotipizacije F1 i F2 generacije genetski modificiranih KO mutanata za protein Oct1 kreiranih primjenom pristupa editiranja genoma CRISPR/Cas9, prilikom istraživanja koristile su se i zebrice deficijentne za transporter Oct1. Pretpostavka istraživanja bila je da će se uočiti nedostatak djelovanja i lokalizacije transportera Oct1 u usporedbi sa zebricama divljeg tipa. Također, analizom

ekspresijskih profila membranskih transportera zebrica po embrionalnim i ličinačkim stadijima napravljenih *in silico*, uspoređen je obrazac ekspresije transportera Oct1 s drugim transporterima iz porodice Slc22.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

- Pufferi i mediji

Ime	Sastav
agarozni medij LB	w/v (tripton) = 0.5%, w/v (NaCl) = 0.5%, w/v (ekstrakt kvasca) = 0.25%, w/v (agar) = 0.75%
citratni puffer, pH 3 (CT3)	w/v (limunska kiselina) = 0.21%
citratni puffer, pH 6 (CT6)	CT3 : CT8 = 1 : 1
citratni puffer, pH 8 (CT8)	w/v (natrijev citrat dihidrat) = 0.294%
medij DMEM	od proizvođača (<i>Capricorn Scientific</i>)
medij E3	c (NaCl) = 250 mM, c (KCl) = 8.5 mM, c (CaCl ₂) = 16.5 mM, c (MgSO ₄) = 16.5 mM, pH = 7.8
medij OCT (engl. <i>optimal cutting temperature</i>)	w/v (polivinil alkohol) = 10.24%, w/v (polietilen glikol) = 4.26% (<i>Leica Biosystems</i>)
medij <i>Vectashield</i>	od proizvođača (<i>Vector Laboratories</i>)
puffer <i>high-salt</i> PBS	w/v (NaCl) = 1.8%
puffer PBS	od proizvođača (<i>Sigma</i>)
puffer PBS + NaN ₃	v/v (NaN ₃) = 0.1%
puffer PBSt	10x PBS : 0.1%-tni Tween-20 = 100 : 1
puffer TAE	c (Tris) = 40 mM, c (EDTA) = 1 mM, pH = 8.0
puffer TBSt	c (Tris) = 20 mM, c (NaCl) = 150 mM, w/v (Tween-20) = 0.1%, pH = 7.6
puffer za digestiju embrija	c (Tris-Cl) = 10 mM, c (KCl) = 50 mM, w/v (Tween-20) = 0.3%, pH = 8.5
tekući medij LB (Luria-Bertani)	w/v (tripton) = 1 %, w/v (NaCl) = 1%, w/v (ekstrakt kvasca) = 0.5%

- **Standardne kemikalije**

Ime	Proizvođač
agaroz	<i>Sigma</i>
ampicilin	<i>Alfa Aesar</i>
etanol	<i>Kemika</i>
glicin	<i>Kemika</i>
ksilol	<i>Kemika</i>
metanol	<i>Kemika</i>
<i>low-fat</i> mlijeko u prahu	<i>Roth</i>

MS-222 (trikain metansulfonat)	v/v (MS-222) = 5%, u mediju E3
feniltiourea (PTU, engl. <i>phenylthiourea</i>)	<i>Sigma</i>
paraformaldehid (PFA)	<i>Sigma</i>
propanol	<i>Kemika</i>
saharoza	<i>Kemika</i>
SDS	<i>Roth</i>
triton X-100 (T-X-100)	<i>Merck</i>

- **Proteini**

Ime	Proizvođač
DNA-polimeraza <i>Phusion</i>	izolirana iz bakterija u LME
fetalni goveđi serum (FBS, engl. <i>fetal bovine serum</i>)	<i>Capricorn Scientific</i>
goveđa želatina	<i>dr. Oetker</i>
goveđi serumski albumin (BSA engl. <i>bovine serum albumin</i>)	<i>Roth</i>
proteinaza K	<i>Alfa Aesar</i>
tripsin	<i>Sigma</i>

- **Fluorescentne boje**

Ime	Proizvođač
2,7-dCIF	<i>Alfa Aesar</i>
5-CF	<i>Sigma</i>
6-CF	<i>Sigma</i>
ASP+	<i>Sigma</i>
Berb	<i>Sigma</i>
DAPI	<i>Sigma</i>
Kalc-AM	<i>Molecular Probes</i>
LY	<i>Sigma</i>
MPP+	<i>Sigma</i>
Rh 123	<i>Sigma</i>
Rh B	<i>Sigma</i>

- **Stanice**

Ime
stabilna stanična linija HEK293T-drOct1
ultrakompetentne bakterije <i>E. coli XL-Gold</i>

- **Antitijela**

Ime	Proizvođač	Specifičnosti
anti-zfOct1 (530-544 ak)	<i>Genosphere Biotechnologies</i>	proizvedeno u zecu protiv zebričinog Oct1
anti-zfOct1 (45-60 ak)	<i>Genosphere Biotechnologies</i>	proizvedeno u zecu protiv zebričinog Oct1
GAR-CY3 (<i>goat anti-rabbit</i>)	<i>Jackson ImmunoResearch Laboratories</i>	proizvedeno u kozi protiv zečjih IgG, fluorofor je CY3

- **Nukleotidi i oligonukleotidi**

Ime	Proizvođač
Otopina smjese nukleotida (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) <i>dNTP Mix</i>	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
početnica F	<i>Invitrogen</i>
početnica R	<i>Invitrogen</i>
DNA marker veličina	<i>Thermo Fisher Scientific</i>

- **Boje za elektroforezu**

Ime	Proizvođač
<i>Gel-Star Nucleic Acid Gel Stain</i>	<i>Lonza</i>
boja za nanošenje uzoraka na gel DNA <i>Gel Loading Dye (6X)</i>	<i>Thermo Fisher Scientific</i>

- **Komercijalni kompleti**

Ime	Proizvođač
<i>PCR & DNA Cleanup Kit</i>	<i>Monarch</i>
<i>CloneJET™ PCR Cloning Kit</i>	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
<i>Plasmid Miniprep Kit</i>	<i>Zymo Research</i>

- **Računalni programi**

Ime
<i>Motic Images Plus (v2.0)</i>
<i>Image Lab (v6.1)</i>
<i>ImageJ (v1.53c)</i>
<i>ApE (v3.0.5)</i>
<i>BioEdit (v7.2.)</i>

- **Uredaji**

Naziv	Ime		Proizvođač	
adapter za gledanje fluorescencije na mikroskopskoj lupi	<i>SFA-RB, SFA-GR</i>		<i>NIGHTSEA</i>	
centrifuge	<i>Universal 32R</i>	<i>MIKRO 120</i>	<i>Hettich</i>	
fluorescentni mikroskop	<i>OPTON III RS</i>	<i>AE31E</i>	<i>Oton Feintechnik</i>	<i>Motic</i>
inkubator za embrije i stanice	<i>TC 135 S</i>	<i>Galaxy 170S</i>	<i>Lobibond</i>	<i>Eppendorf</i>
inkubator-tresilica	<i>Innova 40 Incubator Shaker</i>		<i>Eppendorf</i>	
kamera za mikroskop	<i>DS 126761</i>	<i>Spot RT</i>	<i>Canon</i>	<i>Diagnostic Instruments</i>
kriomikrotom	<i>CM 1850</i>		<i>Leica</i>	
mikroskopska lupa	<i>SMZ-171-TLED</i>		<i>Motic</i>	
mikrovalna pećnica	<i>M1712N</i>		<i>Samsung</i>	
PCR uređaj	<i>T1000 Termal Cycler</i>		<i>Bio-Rad</i>	
spektrofotometar	<i>BioSpec-nano</i>		<i>Shimadzu</i>	
sterilni kabineti	<i>LaminAir HB2448</i>	<i>KTB-NS</i>	<i>Heraeus</i>	<i>Klimaoprema</i>
termoblok	<i>Bio TDB-100</i>		<i>Biosan</i>	
tresilica	<i>Rockomat</i>		<i>Technorama</i>	
uređaj za horizontalnu elektroforezu	<i>Biometra Compact XS/S</i>		<i>Analytic Jena</i>	
uređaj za snimanje gelova	<i>ChemiDoc XRS+ System</i>		<i>Bio-Rad</i>	

2.2. Metode

2.2.1. Uzgoj zebrica i mrijest

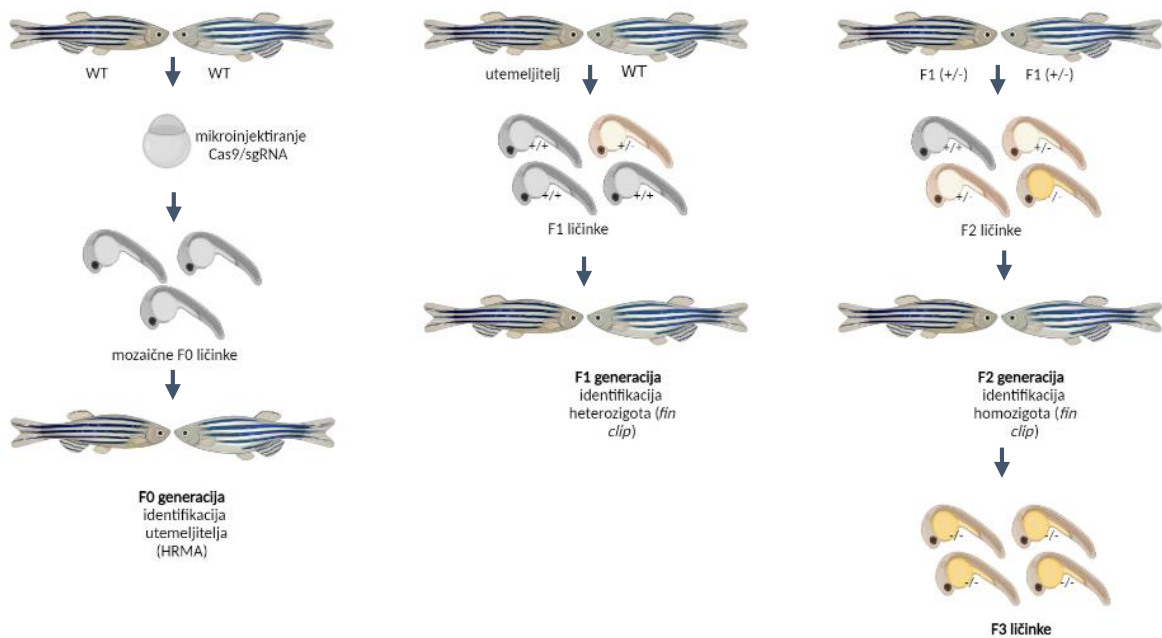
Uzgoj i mrijest riba zebrica odvijao se sukladno Direktivi 2010/63/EU. Odrasle jedinke uzgajane su u akvarijima u kontroliranim laboratorijskim uvjetima uz cikluse tama : svijetlo = 14 : 10 h te navedene parametre: temperatura vode 28 °C, pH 7.5 ± 0.3 , vodljivost 1000 - 1200 $\mu\text{S cm}^{-1}$ i tvrdoća vode 250 mg/l CaCO_3 . Sve eksperimente provodila sam na embrijima starosti 0-5 dpf. Dan prije mrijesta mužjake i ženke stavila sam u mrijestilice. Zebrice se mrijeste ujutro, kada se upali svjetlo (Westerfield 2000), u dijelu akvarija s nižom razinom vode, a njihovi embriji prolaze kroz pore mrijestilice. Nakon mrijesta embrije sam pokupila mrežicom. Stavila sam ih u petrijeve zdjelice u medij E3 te odstranila sve nečistoće. Embriji su se razvijali u inkubatoru pri konstantnoj temperaturi 28 °C i istom fotoperiodu kao odrasle jedinke. Razvojne stupnjeve embrija određivala sam mikroskopskom lupom prema klasifikaciji opisanoj u radu autora Kimmel i sur. (1995).

2.2.2. Genotipizacija F1 i F2 generacije zebrica mutanata za protein Oct1

Oct1 KO (engl. *knock-out*) mutanti stvoreni su metodom editiranja genoma CRISPR/Cas9. Inicijalna genotipizacija F0 generacije Oct1 KO zebrica napravljena je metodom mekšanja (denaturacije) visoke rezolucije (engl. *high resolution melting*, HRM) koja prikazuje varijacije u krivuljama mekšanja uzoraka DNA. One nastaju zbog mutacija, insercija, delecija i drugih promjena u nukleotidnom slijedu, jer temperatura mekšanja, ona pri kojoj se pola molekula DNA nalazi u jednolančanom obliku, ovisi o duljini molekule DNA i udjelu GC baznih parova (Druml i Cichna-Markl 2014). Prije mekšanja uzoraka DNA, potrebno je umnožiti željene fragmente u prisutnosti interkalirajuće fluorescentne boje *SYBR Green*, pomoću komercijalnog kompleta *MeltDoctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems)* koji sadrži smjesu potrebnog enzima, pufera i nukleotida. Kako se boja veže za mali utor dvolančane uzvojnice DNA, emitira se jak fluorescentni signal. Protokol na HRM uređaju *StepOnePlus (ThermoFischer Scientific)* obuhvaća četrdeset ponavljajućih ciklusa denaturacije, elongacije i mjerenja fluorescencije. Nakon zadnjeg ciklusa umnažanja, temperatura reakcije se postepeno povisuje, uzvojnice umnoženih DNA se denaturiraju pa dolazi do otpuštanja boje *SYBR Green* čime se smanjuje fluorescentni signal.

Analizom te promjene fluorescencije pomoću računalnog programskog paketa *High Resolution Melt Software* (v3.2.) mogu se odrediti razlike u T_m pojedinih molekula. Kako su uzorci s mutacijom drugačijeg nukleotidnog slijeda od uzoraka divljeg tipa, pokazat će različite temperature mekšanja, tj. pri različitim temperaturama dolazi do denaturacije DNA. Na taj način odredilo se postojanje mutacija u uzorcima.

Odrasle jedinke F0 Oct1 KO zebrića križane su sa zebrićama divljeg tipa. U njihovom potomstvu, nakon sekvenciranja (tvrtka *Macrogen*, Amsterdam, Nizozemska), uočila se delecija od 50 parova baza (pb) u 1. egzonu jednog alela kojom dolazi do preranog STOP kodona i prestanka translacije već na početku gena. F0 KO mutanti, koji posjeduju mutaciju u germinativnoj liniji stanica i u mogućnosti su prenositi stvorenu mutaciju na potomstvo smatraju se utemeljiteljima (eng. *founders*) mutantne linije. Utemeljitelji su križani sa zebrićama divljeg tipa te upotrebljeni za uzgoj F1 linije s udjelom heterozigota za mutaciju 25%. Kako bi identificirala heterozigote i njihovim križanjem dobila F2 liniju s udjelom homozigota za mutaciju 25%, te njihovim križanjem dobila homozigotne embrije deficijentne za protein Oct1, provela sam postupke genotipizacije (Slika 5).



Slika 5. Slijed dobivanja generacija KO mutanata zebrića.

2.2.2.1. Izolacija DNA iz repnih peraja

Peraje zebrice mogu se djelomično amputirati u svrhu provjera molekularnih, genetskih ili biokemijskih markera pojedinačnih riba. Potrebno je odrezati vrh jednog kraka repne peraje, tzv. *fin clipping*, iz kojeg se u daljnjim koracima izolira DNA i provodi postupak genotipizacije. Rezanje peraje je jednostavno i brzo te često rezultira minimalnim krvarenjem i bez kliničkog ishoda. Najčešće se reže repna peraja zbog brže regeneracije u odnosu na analnu i leđnu peraju, te jednostavnijeg uklanjanja i promatranja u odnosu na prsnu i trbušnu peraju (Westerfield 2000). Repna peraja izuzetno brzo započinje svoju regeneraciju – ponovna epitelizacija i lokalna dezorganizacija mezenhima počinju već nakon 12 sati, a potpuna regeneracija, ovisno o temperaturi, se očekuje u roku od tri tjedna (Jaźwińska i Sallin 2015).

Odabrane ribe zebrice sam odvojila i jednu po jednu ubacila u 100 ml prethodno pripremljenog anestetika, 5%-tnog MS-222. Kada se riba prestala kretati, plastičnom žlicom sam ju prebacila na čistu petrijevu zdjelicu. Skalpelom sam joj odrezala vrh repne peraje te ga odmah stavila u epruvetu u ledenom stalku te kasnije pohranila na -20 °C. Ribu sam prebacila u odvojeni akvarij gdje je ostala do završetka genotipizacije.

U uzorke repnih peraja dodala sam 50 µl pufera za digestiju embrija. Nakon inkubacije od deset minuta pri 98 °C te hlađenja, u svaki uzorak dodala sam 5 µl enzima proteinaze K (20 mg/ml). Daljnja inkubacija trajala je tri sata pri 55 °C te deset minuta pri 98 °C za inaktivaciju enzima. Na ohlađene sam uzorke dodala 100 µl vode i centrifugirala ih 30 minuta pri 4 °C na 10 000 g. Supernatante sam pohranila na -20 °C.

2.2.2.2. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda umnažanja specifičnih slijedova DNA *in vitro*. Pozicioniranjem dviju početnica, kraćih oligonukleotida komplementarnih suprotnim lancima DNA (uzvodne, engl. *forward*, F i nizvodne, engl. *reverse*, R), umnaža se fragment DNA između njih. Produkt jednog ciklusa polimerazne aktivnosti postaje kalup sljedećeg ciklusa, čime se postiže lančana reakcija (Bartlett i Stirling, 2003). Jedan PCR ciklus sastoji se od tri faze određene temperaturom i vremenom trajanja. U fazi

denaturacije razdvajaju se lanci DNA na koje se vežu početnice u sljedećoj fazi hibridizacije, a njihove 3'-OH krajeve u fazi elongacije koristi termostabilna DNA-polimeraza za početak sinteze novog lanca DNA u smjeru 5' prema 3' koristeći slobodne deoksiribonukleotide (engl. *deoxynucleotide triphosphate*, dNTP) (Saiki i sur. 1988).

U svrhu genotipizacije Oct1 mutanata, provela sam tzv. *Phusion* PCR, uz pomoć DNA polimeraze *Phusion HF* (engl. *high fidelity*, visoka vjernost), s prethodno dizajniranim početnicama koje okružuju mjesto poznate delecije u 1. egzonu gena. Uz 5' → 3' polimeraznu aktivnost, polimeraza *Phusion* posjeduje i 3' → 5' egzonukleaznu aktivnost čime se postiže visoka vjernost replikacije DNA. Također, umnoženi fragmenti imaju tupe krajeve (engl. *blunt ends*) koji se mogu izravno ligirati u plazmid. Temperaturu vezanja početnica izračunala sam pomoću mrežne stranice *T_m Calculator* (www.tmcaculator.neb.com), a vremena trajanja koraka PCR-a prilagodila sam duljini fragmenta koji se umnožava (wt = 154 pb, KO = 104 pb).

Tablice 1 i 2. Popis sastojaka smjese te vremena trajanja i temperature koraka *Phusion* PCR-a za umnažanje fragmenta gena *Oct1*.

sastojci smjese	volumen (μl)	ciklus	denaturacija	vezanje početnica	ekstenzija
H ₂ O	9.6	1	98 °C, 30 s		
5x pufer <i>Phusion HF</i>	4	2-35	98 °C, 10 s	64 °C, 30 s	72 °C, 10 s
smjesa dNTP-ova (10 mM)	0.4	35			72 °C, 10 min
početnica F (10 μM)	1				
početnica R (10 μM)	1				
polimeraza <i>Phusion</i>	1				
uzorak	3				

2.2.2.3. Agarozna gel elektroforeza nukleinskih kiselina

Elektroforeza je kretanje električki nabijenih čestica u otopini pod djelovanjem električnog polja. Nukleinske kiseline su negativno nabijene pri neutralnom pH te se tijekom elektroforeze kreću prema pozitivnom polu, anodi. Kraće molekule DNA/RNA se gibaju brže od dužih zbog učinka molekulskog sita agaroze, linearnog polimera D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze. Naime, molekule manje molekularne mase se lakše kreću između pora gela, dok molekule veće

mase zaostaju. Veličina pora obrnuto je proporcionalna koncentraciji agaroze, kao i mogućnosti razdvajanja molekula slične dužine. Stoga, uspoređujući poziciju željenog fragmenta DNA na gelu s pozicijom DNA standarda poznate molekulske težine (DNA *ladder*), može se odrediti masa, tj. duljina željenog fragmenta (Voytas 2001). Za vizualizaciju nukleinskih kiselina nakon elektroforeze koriste se molekule koje interkaliraju između dušičnih baza u dvostrukoj uzvojnici DNA te emitiraju svjetlost određene valne duljine kao rezultat apsorpcije ultraljubičaste svjetlosti (Lee i sur. 2012).

Kako se na taj način može reproducibilno i točno karakterirati fragment DNA prema veličini, agaroznom gel elektroforezom moguća je genotipizacija jedinki u slučaju različitosti alela po duljini. U slučaju Oct1 KO delecije od 50 pb, mutirani i WT aleli mogu se dobro razlikovati na gelu.

Otapanjem 2 g agaroze u 100 ml pufera TAE pripremila sam 2%-tni agarozni gel. Otopinu sam zagrijavala u mikrovalnoj pećnici otprilike tri minute pri 600 W kako bi se agarozna rastopila. Nakon hlađenja pod mlazom vode, u otopinu agaroze sam dodala 0.7 µl boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina *Gel-Star Nucleic Acid Gel Stain*. Gel sam izlila u aparaturu za elektroforezu u koju sam stavila odgovarajući češljic za jažice. Nakon 30 minuta polimerizacije, izvadila sam češljic i aparaturu napunila puferom TAE. U jažice na gelu nanijela sam 6 µl uzoraka umnoženih PCR-om koje sam prethodno razrijedila šest puta bojom za nanošenje *DNA Gel Loading Dye (6X)*. Također, na gel sam nanijela i 1 µl DNA markera veličina (*GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use.*) Nakon otprilike 40 minuta elektroforeze pri 110 V, nukleinske kiseline na gelu vizualizirala sam u uređaju za snimanje gelova *ChemiDoc XRS+ System*.

2.2.2.4. Pročišćavanje DNA

Kako bih u daljnjim koracima kloniranja koristila samo umnoženi fragment željene DNA, uzorke dobivene nakon metode PCR potrebno je pročititi, za što sam koristila komercijalni komplet *Monarch PCR & DNA Cleanup Kit*. Uzorke sam razrijedila puferom za vezanje u omjeru 5:1 te cijelu smjesu nanijela na kolonu za purifikaciju te centrifugirala jednu minutu pri 16 000 g (ista brzina za sva centrifugiranja). Nakon toga sam dvaput provela korake dodavanja 200 µl pufera za ispiranje i centrifugiranja jednu minutu. Zatim sam na matriks kolone dodala 10 µl vode

zagrijane na 50 °C te tako eluirala željenu DNA. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi od jedne minute i centrifugiranja jednu minutu, uzorcima sam odredila masenu koncentraciju.

2.2.2.5. Određivanje masene koncentracije nukleinskih kiselina

Za određivanje masene koncentracije i čistoće nukleinskih kiselina koristila sam spektrofotometar *BioSpec-nano*. Mjerenjem apsorbancije malog volumena uzorka (1 µl) pri valnim duljinama apsorbancije nukleinskih kiselina (A_{260}), proteina, odnosno aromatskih aminokiselina (A_{280}) te organskih otapala (A_{230}), dobila sam podatak o masenoj koncentraciji DNA (A_{260} , izražena kao ng/µl), onečišćenosti uzorka proteinima (omjer A_{260}/A_{280}) te onečišćenosti uzorka organskim otapalima i solima (omjer A_{260}/A_{230}) (Koetsier i Cantor 2019). Prije analize uzoraka, izmjerila sam apsorbanciju otopine u kojoj su uzorci bili eluirani (voda) za nuliranje uređaja.

2.2.2.6. Kloniranje

2.2.2.6.1. Ligacija

Prethodno umnožen i pročišćen fragment gena *Oct1* klonirala sam u plazmidni vektor *pJET1.2/blunt* pomoću komercijalnog kompleta *CloneJET PCR Cloning Kit*. Linearizirani vektor *pJET1.2/blunt* pozitivnom selekcijom zbog letalnog gena u mjestu insercije omogućuje učinkovito kloniranje produkata PCR-a. Vektor ima i negativnu selekciju zbog rezistencije na antibiotik ampicilin (www.snapgene.com). Smjesu za ligaciju pripremila sam prema Tablici 3 te inkubirala dva sata pri 16 °C ili preko noći pri 22 °C.

Tablica 3. Popis sastojaka ligacijske smjese.

sastojci smjese	volumen (µl)
DNA ligaza T4	0.5
reakcijski pufer 2x	5
vektor za kloniranje <i>pjet1.2/blunt</i> (50 ng/µl)	0.5
pročišćeni produkt PCR-a	*
H ₂ O	do 10

*Volumen pročišćenog uzorka ovisio je o izmjerenoj koncentraciji.

2.2.2.6.2. Transformacija bakterija

Prije samog postupka transformacije bakterija pripremljenim plazmidom, u sterilnom kabinetu sam napravila hranjive podloge od čvrstog agaroznog hranjivog medija s dodatkom ampicilina (1:1000). Koristila sam u laboratoriju prethodno pripravljene ultrakompetentne bakterije *E. coli XL-Gold*, prema prilagođenom protokolu za 5-alpha kompetentne stanice *E. coli (NEB)* (www.nebiolabs.com.au)

Na 25 µl bakterija dodala sam 1 µl prethodno pripravljene ligacijske smjese. Uzorke sam inkubirala 30 minuta na ledu, tijekom čega se plazmid vezao za stijenku bakterija, uz prisutnost kationa iz pufera. Nakon toga je uslijedio toplinski šok 40 sekundi pri 42 °C na termobloku te dvije minute ponovno na ledu. Ta nagla promjena temperature omogućila je ulazak plazmida u bakteriju kroz stvorene pore u membrani (Panja i sur. 2008). Nakon dodatka 475 µl zagrijanog tekućeg medija LB, uzorke sam inkubirala 60 minuta pri 37 °C uz trešnju od 225 rpm, u inkubatoru-tresilici *Innova 40 Incubator Shaker*. Zatim sam 250 µl uzoraka izlila i staklenim kuglicama rasporedila na prethodno pripremljene agarozne hranjive podloge s dodatkom ampicilina. Bakterijske ploče sam pohranila preko noći na 37 °C.

2.2.2.6.3. Izrada tekućih prekonocnih bakterijskih kultura

Tekući bakterijski medij LB pripremila sam dodatkom medija LB zagrijanog na 37 °C i ampicilina u omjeru 1:1000. Nakon što su na hranjivoj podlozi narasle transformirane bakterijske kolonije, odabrala sam po tri kolonije iz svake podloge te ih nastavkom za mikropipete prenijela u epruvetu s tekućom podlogom. Bakterije sam inkubirala preko noći pri 37 °C uz trešnju od 225 rpm u inkubatoru-tresilici *Innova 40 Incubator Shaker*.

2.2.2.6.4. Izolacija plazmida iz bakterija

Nakon što sam dobila tekuću kulturu bakterija s ubačenim plazmidom, iz njih sam izolirala plazmid pomoću komercijalnog kompleta *Plasmid Miniprep Kit*. Bakterijske kolonije sam centrifugirala 5 minuta pri 6 000 g. Na talog sam dodala 200 µl pufera P1 te nakon dodatka 200 µl pufera P2 i inkubacije dvije minute, na uzorke sam dodala 400 µl hladnog pufera P3 te ih ponovno inkubirala dvije minute. Uzorke sam centrifugirala četiri minute na 11 000 g (brzina svakog daljnjeg centrifugiranja). Nastali supernatant sam prebacila u kolone za sakupljanje uzoraka te ih centrifugirala 30 sekundi nakon čega sam u kolonu dodala 200 µl pufera *Endo-Wash* te ponovila centrifugiranje. Dodatkom 400 µl pufera *Plasmid Wash* i centrifugiranja jednu minutu, na matriks kolone sam dodala 30 µl vode zagrijane na 40 °C. Nakon jedne minute inkubacije, uzorke sam centrifugirala 30 sekundi. Masenu koncentraciju eluiranog plazmida odredila sam prema protokolu opisanom u poglavlju 2.2.2.5.. Uzorke sam poslala na sekveniranje u tvrtku *Macrogen*.

2.2.2.7. Analiza nukleotidnih sekvenci

Dobivene nukleotidne sekvence sam analizirala pomoću računalnih programa *ApE* (v3.0.5) i *BioEdit* (v7.2.). Sekvence gena *Oct1* ribe zebrice (divlji tip) preuzela sam s mrežne stranice *Ensembl* (www.ensembl.org). Poravnanjem dobivenih nukleotidnih sekvenci sa sekvencom divljeg tipa odredila sam lokaciju i tip nastale mutacije. Promjene na proteinskoj razini vidjela sam konverzijom sekvenci u aminokiselinski slijed.

2.2.3. Praćenje akumulacije fluorescentnih boja u embrijima zebrice *in vivo*

Za praćenje akumulacije fluorescentnih boja u embrijima *in vivo* koristila sam embrije zebrica divljeg tipa i *Oct1* KO homozigotne embrije. Pretraživanjem literature s naglaskom na istraživanja sličnih proteina sisavaca odabrala sam potencijalne modelne fluorescentne supstrate za kationski transporter *Oct1* i anionske transportere *Oat*. Tijekom eksperimenata varirala sam vrijeme izlaganja embrija spojevima, starost embrija te koncentraciju spojeva; parametri pojedinih eksperimenata prikazani su u grafovima kod pojedinih spojeva u poglavlju Rezultati. Prije samih eksperimenata i prije nego su embriji navršili 24 h starosti (i počeli razvijati melanocyte), dio

embrija sam prebacila u medij E3 s dodatkom 75 μ M feniltiouree (PTU) za zaustavljanje pigmentacije (Karlsson i sur. 2001). Tako sam istražila utjecaj pigmentacije na akumulaciju i vizualizaciju fluorescentnih spojeva. Kada sam eksperimente izvodila na embrionalnim stadijima zebrice, kada još uvijek postoji korion, dio embrija sam mehanički dekorionizirala, pomoću oštih pinceta i lupe. Na taj način istražila sam utjecaj koriona na akumulaciju fluorescentnih spojeva.

2.2.3.1. Inkubacija embrija zebrice u otopini fluorescentnih boja

U eksperimentima na embrijima starosti 24-120 hpf ispitivala sam akumulaciju devet različitih boja: ASP+, LY, 2,7-dCIF, 5-CF, 6-CF, Rh123, RhB, Berb te Kalc-AM. Za inkubaciju embrija koristila sam mikroploču s 24 jažice, od kojih je svaka jažica sadržavala oko 10 embrija u 2 ml medija E3 s dodatkom fluorescentne boje. Koncentracije boje bile su temeljene na prethodno određenim K_m vrijednostima za pojedine transportere, kako je navedeno u Uvodu. Nakon određenog vremena inkubacije u inkubatoru u mraku pri 28 °C, embrije sam temeljito isprala od boje pomoću malih filtera za akvarije i medija E3. Zatim sam ih stavila u otopinu prethodno pripremljenog 5%-tnog anestetika MS-222 u malim staklenim petrijevkama. Akumulaciju boja pratila sam na fluorescentnom mikroskopu Motic AE31E, ili, ako mikroskop nije bio dostupan, na mikroskopskoj lupi Motic SMZ-171-TLED uz adapter za gledanje fluorescencije određene valne duljine. Koncentracija boja, vrijeme izlaganja bojama (engl. *hours post staining*, hps) kao i starost embrija (hpf ili dpf) prilikom promatranja akumulacije odredila sam nakon prvih rezultata, za svaku boju pojedinačno. Stoga, broj odrađenih eksperimenata s varijacijama u te tri varijable razlikuje se između boja, te su grafički prikazani u poglavlju Rezultati.

2.2.3.2. Mikroinjektiranje žumanjčane vreće embrija zebrice otopinom fluorescentnih boja

Mikroinjektiranje kapilarnim tlakom je mehanička metoda unošenja egzogenih tvari u stanicu ili organizam pri kojoj se kroz staničnu membranu/kožu prodire tankom mikrokapilaram. Zbog povišenog tlaka izbacivanja dolazi do izbacivanja tekućine iz kapilare, a zadržavajući tlak koristi se za sprječavanje povratnog punjenja kapilare otopinom iz stanice (Kuncova i Kallio 2004).

Mikroinjektiranje jednostaničnih stadija embrija zebrice često se koristi za njihovu gensku modifikaciju, u kombinaciji sa sustavom CRISPR/Cas9 (Xin i Duan, 2018). Tom metodom dobiveni su Oct1 KO mutanti. Međutim, u embrije i starije zebrice mogu se mikroinjektirati i fluorescentne boje za proučavanje razvoja embrija (Kimmel i Law 1985a, 1985b, 1985c; Stainier i sur. 1993) ili anatomije (Gutzman i Sive 2009; Smith i sur. 2015). Ja sam mikroinjektiranje fluorescentnih boja u žumanjčanu vreću koristila za praćenje njihove akumulacije *in vivo*. U odnosu na vizualizaciju akumulacije boja putem inkubacije embrija u otopini boja, mikroinjektiranjem sam boje izravno unijela u žumanjčanu vreću embrija, tako olakšajući njihov ulazak u tijelo embrija.

Embrije starosti 3 dpf stavila sam u otopinu prethodno pripremljenog 5%-tnog anestetika MS-222. Za organizaciju embrija prilikom injektiranja koristili smo agarozne kalupe. Pripremljene otopine fluorescentnih boja ASP ($c = 10 \mu\text{M}$) i LY ($c = 1 \mu\text{M}$) unijela sam u kapilare. Nakon podešavanja mikroinjektora na određen tlak i duljinu vremena injektiranja, pažljivo sam usmjerila kapilaru u žumanjčanu vreću embrija te injektirala boju, otprilike 1 nl. Mikroinjektirane embrije sam odmah potom promatrala fluorescentnim mikroskopom.

2.2.4. Priprema kriopreparata embrija zebrice

Iako su manje stabilni od parafinskih prereza, tanki prerezi brzo smrznutog tkiva pogodni su za očuvanje antigenosti prilikom imunofluorescencijskih metoda (Fischer i sur., 2008). Brzo i jednostavno ih je napraviti te su pogodni za osjetljiva i krhka tkiva poput embrija zebrice (Ferguson i Shive 2019).

2.2.4.1. Fiksacija embrija zebrice

Embrije zebrice genotipa WT i Oct1 KO starosti 4 dpf fiksirala sam prema prilagođenom protokolu (Ferguson i Shive. 2019) u 4%-tnom PFA 1 h na sobnoj temperaturi uz miješanje. Zatim sam ih prebacila u 1 000 μl PBSt pufera te tako isprala dva puta po pet minuta. Nakon toga sam inkubirala embrije u 1 000 μl otopine 30%-tne saharoze uz miješanje, sve dok nisu potonuli na dno tubice (otprilike nakon jednog sata). Otopinu saharoze sam tada zamijenila s 1 000 μl otopine 2.5%-tne goveđe želatine/25%-tne saharoze u kojoj su embriji inkubirani preko noći uz miješanje. Pola

volumena otopine sam zamijenila s medijem OCT te sam embrije inkubirala na sobnoj temperaturi uz miješanje sve dok nisu potonuli na dno tubice (otprilike nakon 90 minuta). Zatim sam ponovno pola otopine zamijenila s medijem OCT te ponovno inkubirala embrije do potonuća. Taj korak sam provela još jedanput.

Fiksirane embrije sam premjestila u plastične kriokalupe i pomoću iglica i lupe ih namjestila u željenu orijentaciju, na bočnu stranu tijela. Kriokalup sam zatim napunila do pola s medijem OCT. Nakon što sam pohranila kriokalupe na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ispunila sam ostatak kriokalupa medijem OCT.

2.2.4.2. Rezanje kriopreparata

Uzorke zamrznute u mediju OCT izvadila sam iz kriokalupa i izrezala u ravnini s embrijima. Stavila sam ih na držače za rezanje te dodatno uklopila medijem OCT i stavila u kriomikrotom namješten na debljinu prereza $8\text{ }\mu\text{m}$ i temperaturu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kako bih imala poprečne presjeke svih dijelova tijela, svaki uklopljeni uzorak izrezala sam u tri serije po devet prereza. Prva serija uzoraka sadržavala je prvenstveno područje glave embrija, druga serija unutarnje organe poput početka probavnog sustava i bubrega, a u trećoj seriji prevladavali su jetra i repni dio embrija. Uzorke sam pažljivo rezala te nanosila na pozitivno nabijene predmetnice. Kriopreze sam pohranila u kutiju na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.5. Imunofluorescencijske metode

Imunofluorescencijske metode služe za određivanje prisutnosti i substancične lokalizacije proteina u stanicama i tkivima. Često se koriste na zebricama zbog mogućnosti lokalizacije proteina u cijelim embrijima i ličinkama, kao i na presjecima (Macdonald 1999). Princip svih imunoloških metoda detekcije temelji se na primarnom antitijelu specifičnom za protein i sekundarnom antitijelu specifičnom za primarno antitijelo. Većina monoklonskih i poliklonskih primarnih antitijela su imunoglobulini klase IgG, stoga je većina sekundarnih antitijela anti-IgG. Na sekundarna antitijela konjugirani su fluorofori, molekule koje apsorbiraju svjetlost određene valne duljine nakon čega emitiraju svjetlost duže valne duljine. Najčešće korišteni fluorofori su derivati cijanina,

fluoresceina i rodamina (Johnson 2012), a njihovi signali promatraju se fluorescentnim mikroskopom.

2.2.5.1. Imunocitokemija

Za imunofluorescencijsku substancičnu lokalizaciju proteina Oct1 koristila sam stabilnu staničnu liniju HEK293T-drOct1. Prilikom uzgoja stanica koristila sam medij DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle medium*, Dulbeccov modificirani Eagle medij) s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS). Stanice su pohranjene u staničnom inkubatoru konstantnih uvjeta temperature od 37 °C i vlažne atmosfere s 5% CO₂.

Stanice sam nasadila na okrugle staklene pokrovnice u mikroploču s 24 jažica pri gustoći 5×10^5 stanica/mL. Inkubirala sam ih u inkubatoru za stanice 24 ili 48 h do 80% konfluentnosti. Tada sam stanice fiksirala u 4%-tnom PFA, inkubacijom od 25 minuta. Stanice sam triput isprala u otopini 100 mM glicin/PBS te ih permeabilizirala inkubacijom u metanolu 15 minuta te ponovno triput isprala u PBS-u. Za povratak antigena koristila sam SDS zagrijan u toploj kupelji, inkubacijom od 5 minuta. Za blokiranje sam koristila 5%-tnu otopinu mlijeka u prahu u TTBS-u uz inkubaciju od 30 minuta. Zatim sam pokrovna stakalca stavila na mikroskopske predmetnice i inkubirala ih s Oct1 antitijelom razrijeđenim PBS-om 1:100 tijekom jednog sata u vlažnoj komori pri 37 °C. Zatim sam stanice triput isprala u PBS-u te inkubirala ih u sekundarnom antitijelu GAR-CY3 razrijeđenim 1:400, jedan sat u vlažnoj komori pri 37 °C. Na kraju, stanice sam ponovno triput isprala u PBS-u. Jezgre stanica sam vizualizirala inkubacijom u fluorescentnom interkalatoru DAPI (300 nM DAPI/PBS), inkubacijom 45 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon posljednjeg ispiranja u PBS-u, pokrovnice sa stanicama sam uklopila na mikroskopske predmetnice u mediju za očuvanje fluorescencije *Vectashield* te pohranila na +4 °C do detekcije fluorescencije invertnim fluorescentnim mikroskopom (Motic AE31E).

2.2.5.2. Imunohistokemija

Priprema uzoraka za imunohistokemijske analize uključuje fiksaciju, tj. imobilizaciju antigena uz zadržavanje stanične i substanične arhitekture. Za to se prvenstveno koriste reagensi koji stvaraju veze između proteina, npr. aldehidi stvaraju metilenske mostove između aminokiselinskih ogranaka. Međutim, takve intra- i intermolekulske veze mijenjaju sekundarnu, tercijsku i kvartarnu strukturu proteina, tako smanjujući dostupnost epitopa antitijelu (D'Amico i sur. 2009). Stoga je prije inkubacije u primarnom antitijelu uzorak potrebno podvrgnuti uvjetima koji će pokidati te veze i povratiti epitop, poput zagrijavanja ili tretiranja enzimima. Optimalna metoda povratka epitopa ovisi o samom epitopu, primarnom antitijelu, vrsti tkiva te metodi fiksacije. Stoga sam prije samog prikupljanja rezultata provela optimizaciju uvjeta za povratak proteina Oct1 na krioprerezima zebrice.

U suradnji s dr. sc. Deanom Karaicom iz Jedinice za molekularnu toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, izabrala sam devet uvjeta, tj. devet različitih protokola kojima sam podvrgnula uzorke. Svi koraci protokola navedeni su u Tablicama 4 i 5. Protokoli se mogu svrstati u četiri skupine: DCT, CT, SDS, *Phalloidin*. DCT (engl. *deparafination and citrate buffers*) protokoli su najduži jer uključuju procese deparafinacije inkubacijom uzoraka u serijama alkohola. Nakon tih koraka, DCT, ali i CT (engl. *citrate buffers*) protokoli uključuju zagrijavanje uzoraka u citratnom puferu, pH vrijednosti 3, 6 ili 8. SDS +/- protokoli temelje se na (ne)inkubaciji uzorka u deterdžentu SDS-u, te daljnjem ispiranju u *high-salt* PBS-u. *Phalloidin* protokol je najkraći i najjednostavniji protokol koji je ime dobio po izvornom proteinu za koji se ovaj protokol koristio. Uzorci su u mom slučaju bili prethodno napravljeni krioprerezi embrija zebrice genotipa WT i Oct1 KO starih 4 dpf. Kao primarna antitijela koristila sam anti-zfOct1 (45-60 ak) i anti-zfOct1 (530-544 ak), a za sekundarno antitijelo koristila sam GAR-CY3.

Nakon tretiranja uzoraka, presjeke sam promatrala i slikala na fluorescentnom mikroskopu *OPTON III RS*. Usporedila sam sve uvjete na temelju intenziteta signala, pozadinskog obojenja i očuvanosti morfologije uzoraka te sam samo one optimalne koristila u ponovljenim eksperimentima.

Tablica 4. Uvjeti korišteni za optimizaciju imunohistokemijske analize gena *Oct1*. Tablica prikazuje postupke tijekom prvog dana.

DCT	CT	SDS	<i>Phalloidin</i>	
Inkubiranje u ksilolu - 30'	+4 °C	+4 °C	+4 °C	
Inkubiranje u propanolu - 5'				
Inkubiranje u 98%-tnom etanolu - 5'				
Inkubiranje u 75%-tnom etanolu - 5'				
Inkubiranje u 60%-tnom etanolu - 5'				
Ispiranje u redestiliranoj vodi - 5'				
Ispiranje u PBS-u - 15'				
Kuhanje u odgovarajućem citratnom puferu (pH 3, 6 ili 8) - 5'				
Pasivno hlađenje na sobnoj temperaturi - 20'				
Ispiranje u PBS-u - 3x 5'				
Ispiranje u 0,5%-tnom T-X-100 - 15'	Ispiranje u PBS-u - 2x 5'	Ispiranje u PBS-u - 15'		
Ispiranje u 2%-tnom T-X-100 - 30'			Inkubiranje SDS+ uzoraka u 1 %-tnom SDS-u - 5'	
			SDS- uzorci ostaju u PBS-u	Ispiranje u 0.1%-tnom T-X-100 - 10'
			Ispiranje u PBS-u - 4x 5'	
Ispiranje u PBS-u - 2x 5'	Ispiranje u PBS-u - 10'			
Inkubiranje u vlažnoj komori pri sobnoj temperature u 1 %-tnom BSA (goveđi serumski albumin, engl. <i>bovine serum albumin</i>) - 30'				
Inkubiranje u primarnom antitijelu u vlažnoj komori pri 4 °C - 12-24 h				

Tablica 5. Uvjeti korišteni za optimizaciju imunohistokemijske analize gena *Oct1*. Tablica prikazuje postupke tijekom drugog dana.

DCT	CT	SDS	<i>Phalloidin</i>
Ispiranje primarnog antitijela u 0.1%-tnom T-X-100 - 10'		Ispiranje primarnog antitijela u <i>high-salt</i> PBS - 2x 5'	+4°C
Ispiranje u PBS-u – 2x 5'			Ispiranje primarnog antitijela u PBS-u - 10'
Inkubiranje u sekundarnom antitijelu u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi – 2 h			
Ispiranje sekundarnog antitijela u 0.1%-tnom T-X-100 - 10'		Ispiranje sekundarnog antitijela u <i>high-salt</i> PBS-u - 5'	Ispiranje sekundarnog antitijela u 0.1%-tnom T-X-100 - 10'
Ispiranje u PBS-u -2x 5'			Ispiranje u PBS-u - 10'
Nanošenje 10 µl medija za očuvanje fluorescencije (<i>Vectashield</i>), prekriti pokrovnicom i prekriti rub lakom za nokte			

2.2.6. Ekspresijski profili membranskih transportera zebrice po embrionalnim i ličinačkim stadijima

Kako bih usporedila ekspresiju membranskog transportera Oct1 s drugim membranskim transporterima embrija zebrice, provela sam analizu ekspresijskih profila membranskih transportera po embrionalnim i ličinačkim stadijima zebrice *in silico*. Ekspresije gena mijenjaju se u ovisnosti o stadiju životnog ciklusa, a regulatorne interakcije gena posebice su važne u doba embrionalnog razvoja, kada tek dolazi do uspostavljanja organskih sustava. Embrionalni razvitak zebrice događa se vrlo brzo, stoga te promjene ekspresije moraju biti brze i precizne (Kudoh i sur. 2001).

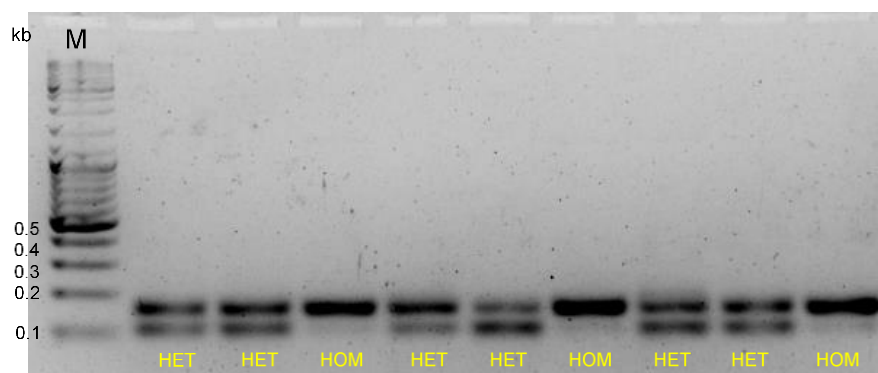
Podatke za analizu ekspresije pretražila sam i preuzela iz baze podataka *Expression Atlas* (<http://www.ebi.ac.uk/gxa>), koja sadrži informacije o ekspresiji gena i proteina u različitim vrstama, njihovim tkivima, razvojnim stadijima te tijekom bolesti ili različitih eksperimentalnih

uvjeta. Ta baza podataka sadrži rezultate rada autora White i sur. (2017) u kojem je predstavljen ekspresijski profil gena tijekom razvoja zebrice dobiven metodom sekvenciranja sintezom iz ukupne RNA. U svojoj analizi koristila sam podatke za ekspresiju gena onih razvojnih stadija zebrice koji su bili unutar vremenskog okvira starosti embrija na kojima sam prethodno promatrala akumulaciju fluorescentnih boja: 24, 30, 36, 48, 72, 96 i 120 hpf. Analizirala sam ekspresiju gena devet članova porodice membranskih transportera Slc22: Oct1 i druge kationske transportere Octn1, Octn2 i Oct6 te anionske transportere Oat3, Oat2c, Oat2e koji su važni transporteri bubrega te Oat1 i Oat2d, među čijim supstratima su anionske fluorescentne boje poput LY i 6-CF.

3. REZULTATI

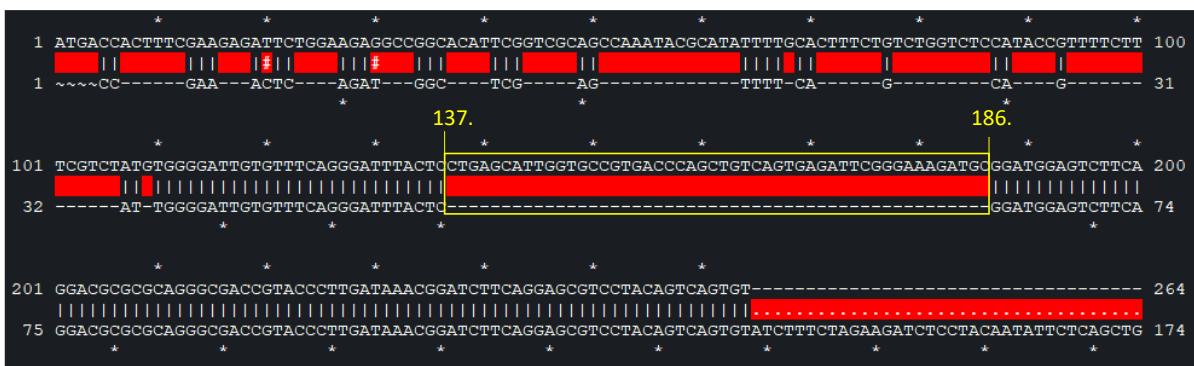
3.1. Genotipizacija F1 i F2 generacije zebrića mutanata za protein Oct1

Na Slici 6 prikazan je jedan od gelova dobivenih agaroznom gel elektroforezom uzoraka repnih peraja prilikom traženja jedinki F1 Oct1 KO linije koje posjeduju jedan mutirani *Oct1* alel (heterozigoti za Oct1, *Oct1*^{Δ137-186/+}). Donja linija prikazuje fragment gena *Oct1* dug 104 pb (mutirani alel s delecijom od 50 pb), a gornja linija je *Oct1* fragment pune duljine, 154 pb (alel divljeg tipa). Stoga, tražene zebriće koje imaju Oct1 KO mutaciju na gelu imaju dva fragmenta, a jedinke koje imaju oba alela divljeg tipa imaju samo jedan dulji fragment. Na prikazanom gelu nalaze se uzorci šest heterozigota i tri homozigota divljeg tipa, što je veći postotak heterozigota od očekivanog, 67% naspram očekivanog 25%. Pronađene heterozigote za mutaciju koristila sam za uspostavljanje F2 Oct1 KO linije.

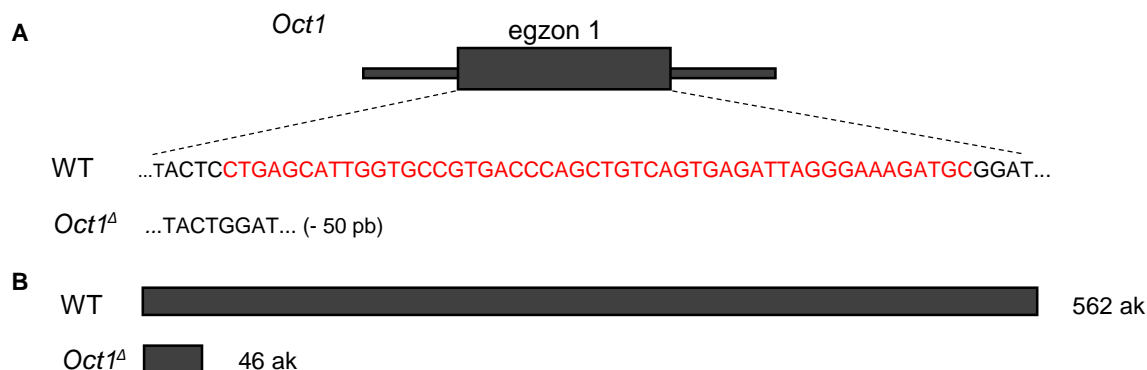


Slika 6. Agarozna gel elektroforeza umnoženih fragmenata 1. egzona gena *Oct1* izoliranih iz repnih peraja zebrića F1 Oct1 KO linije. Genotipovi uzoraka otkriveni s gela su označeni kraticama: *Oct1*^{+/+} = HOM, *Oct1*^{Δ137-186/+} = HET. M = marker veličina nukleinskih kiselina. Korišten je 2%-tni gel.

Sekvenciranjem pojedinih uzoraka heterozigota potvrđena je prisutnost delecije od 50 pb, od 137. do 186. nukleotida (Slika 7), kako je i utvrđeno prema agaroznoj gel elektroforezi.



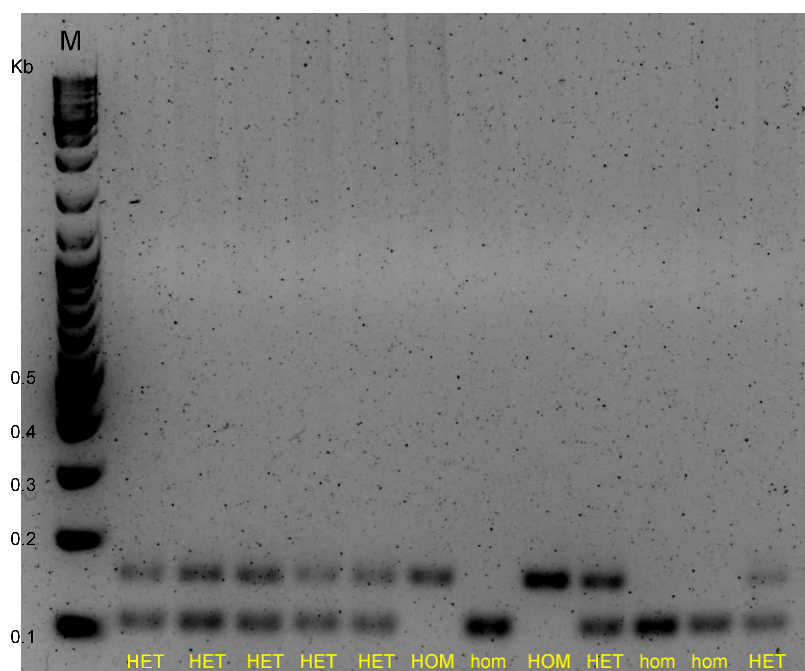
Slika 7. Usporedba sekvence 1. egzona gena *Oct1*, divljeg tipa (gornja) i mutanta (donja). Crvenom bojom označena su odstupanja. Žutim kvadratom i brojevima označena je pozicija delecije. Sekvenca mutanta dobivena je sekvenciranjem putem servisa tvrtke Macrogen. Analiza sekvenci napravljena je računalskim programom *ApE* (v3.0.5).



Slika 8. Usporedba gena *Oct1* divljeg tipa (WT) i mutanta (*Oct1^Δ*) dobivenog metodom CRISPR/Cas9. Crvena boja označuje deletirane nukleotide u egzonu 1 mutanta (A). Duljine aminokiselinske sekvence proteina prikazane su na B.

Na Slici 9 prikazan je jedan od gelova dobivenih agaroznom gel elektroforezom prilikom traženja jedinki F2 *Oct1* KO linije koje posjeduju oba mutirana alela *Oct1* (homozigoti za *Oct1*, *Oct1^{Δ137-186/Δ137-186}*). Donja linija prikazuje fragment gena *Oct1* dug 104 pb (mutirani alel s delecijom od 50 pb), a gornja linija je fragment *Oct1* pune duljine, 154 pb (alel divljeg tipa). F2 linija je dobivena križanjem heterozigotnih *Oct1^{Δ137-186/+}* jedinki. Stoga, njihovo potomstvo može imati jedan od tri genotipa – homozigot divljeg tipa *Oct1^{+/+}* te heterozigot *Oct1^{Δ137-186/+}* i homozigot za mutaciju *Oct1^{Δ137-186/Δ137-186}*. Na gelu, to se vidi kao jedan veći fragment za homozigota divljeg tipa (154 pb), dva fragmenta za heterozigota (104 pb i 154 pb) te jedan manji fragment homozigota za mutaciju (104 pb). Na prikazanom gelu nalaze se uzorci dva homozigota

divljev tipa (17%, očekivano 25%), sedam heterozigota (58%, očekivano 50%) te tri homozigota za mutaciju (25%, očekivano 25%). Pronađene homozigote za mutaciju stavila sam na mrijest. Njihovi embriji su pripadali F3 generaciji, tj. svi su bili homozigoti za mutaciju te sam na njima radila daljnje eksperimente.



Slika 9. Agarozna gel elektroforeza umnoženih fragmenata 1. egzona gena *Oct1* izoliranih iz repnih peraja zebrića F2 *Oct1* KO linije. Genotipovi uzoraka otkriveni s gela su označeni kraticama: *Oct1*^{+/+} = HOM, *Oct1*^{Δ137-186/+} = HET, *Oct1*^{Δ137-186/Δ137-186} = hom. M = marker veličina nukleinskih kiselina. Korišten je 2%-tni gel.

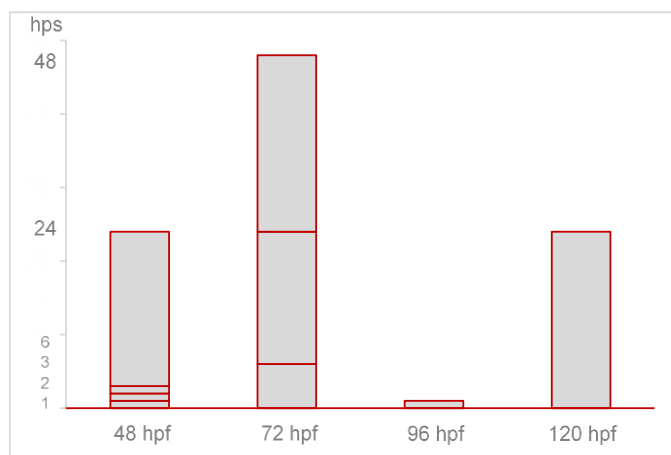
3.2. Praćenje akumulacije fluorescentnih boja u embrijima zebriće *in vivo*

3.2.1. Inkubacija embrija zebriće divljev tipa fluorescentnim bojama

Inkubacijom embrija u otopinama devet različitih fluorescentnih boja, uz variranje starosti embrija, duljine inkubacije i koncentracije boja, dobivene su slike fluorescentnih signala. Zbog sažetosti rada, prikazane su samo one reprezentativne. Natpisi na slikama sadrže informaciju o koncentraciji boje, starosti embrija pri promatranju i vremenu inkubacije.

3.2.1.1. Akumulacija spoja ASP+

Akumulaciju fluorescentne boje ASP+ promatrala sam na mikroskopskoj lupi uz adapter za gledanje fluorescencije *Green* (NIGHTSEA) (ekscitacija na 510-540 nm, emisija pri 600 nm) te na filteru za *Texas Red* (ekscitacija na 560 nm, emisija na 635 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Vremena izlaganja po starostima embrija prikazana su na Slici 10. Korištene koncentracije bile su 1, 10 i 50 μM .



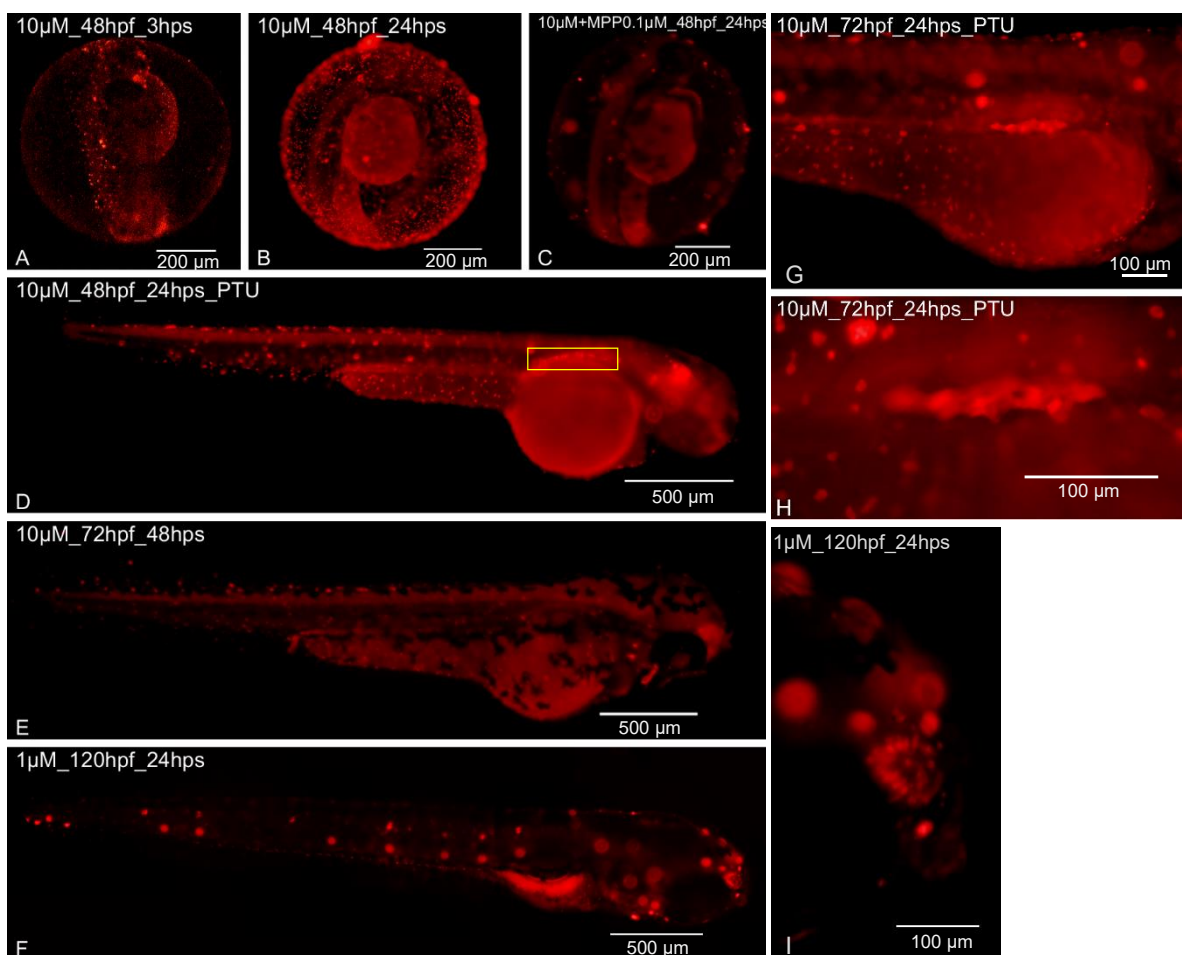
Slika 10. Uvjeti inkubacije embrija u otopini fluorescentne boje ASP+. hpf = engl. *hours post fertilisation*, sati poslije fertilizacije - starost embrija; hps = engl. *hours post staining*, sati poslije dodatka boje - vrijeme izlaganja.

Prema starosti embrija, pri 48 hpf ASP+ se najviše akumulirao u neuromastima (nakupinama senzornih stanica s dlačicama koje detektiraju struju vode), neuralnoj cijevi, žumanjčanoj vreći, pronefrosu i olfaktornom epitelu (Slika 11 D). Također, ASP+ je prolazio kroz korion te se akumulirao u istim strukturama (Slika 11 A, B i C). Signali tih dijelova tijela bili su prisutni i pri 72 hpf (Slika 11 E), a pri 96 i 120 hpf pojavio se i jak signal tek nastalog probavila (Slika 11 F). Signal neuromasta je bio najvećeg intenziteta kod embrija starosti 120 hpf te se pri toj starosti nije moglo više jasno uočiti signal neuralne cijeve, ali i bubrega zbog prevelikog signala probavila i preklapanja signala s njime. Kod mlađih embrija na tjemenu glave olfaktorni epitel se vidio kao dvije kuglaste strukture iznad očiju (Slika 11 E), a kod embrija starosti 120 hpf jasno su se mogle vidjeti kružno poredane izdužene stanice (Slika 11 F i I).

Prema dužini inkubacije, intenzitet signala pojačao se što je vrijeme inkubacije bilo duže (Slika 11 A u odnosu na B), međutim, smanjio se nakon vrlo dugih inkubacija od 48 h (Slika 11

E). Signal olfaktornog epitela bolje se uočio kod kraćih inkubacija (1, 2, 3 hps) nego kod dužih (24 hps) te kod embrija s pigmentacijom u odnosu na depigmentirane embrije (upotrebom PTU).

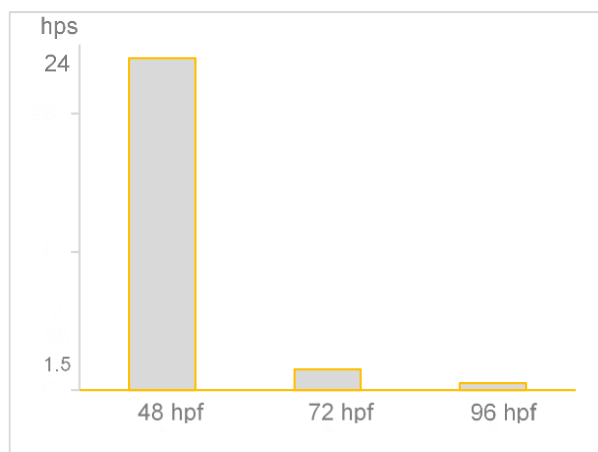
Najintenzivnija akumulacija boje u pronefrosu uočila se na mjestu glomerula, na zebričama starosti 48 hpf (Slika 11 D) i 72 hpf (Slika 11 G i H). Uočio se i tok boje kroz cijelu dužinu tubula te izlučivanje kroz kloaku (Slika 11 D i E). Promjena koncentracije boje uzrokovala je proporcionalnu razliku u intenzitetu signala, a koncentracija 50 μM je bila previsoka. Koinkubacijom embrija sa spojem MPP⁺ (engl. *1-methyl-4-phenylpyridinium*, 1-metil-4-fenilpiridin), modelnim supstratom transportera Oct1, intenzitet signala je smanjen (Slika 11 B u odnosu na s C).



Slika 11. Akumulacija fluorescentne boje ASP⁺ u embrijima zebrice sa korionima (A-C) i bez koriona (D-I). Razlika u inkubaciji ASP-om i inkubaciji ASP+MPP prikazana je na B i C. Na D kvadratom je označen glomerul. Jak signal u glomerulu prikazan je na G i H, a u olfaktornom epitelu na I.

3.2.1.2. Akumulacija spoja berberin

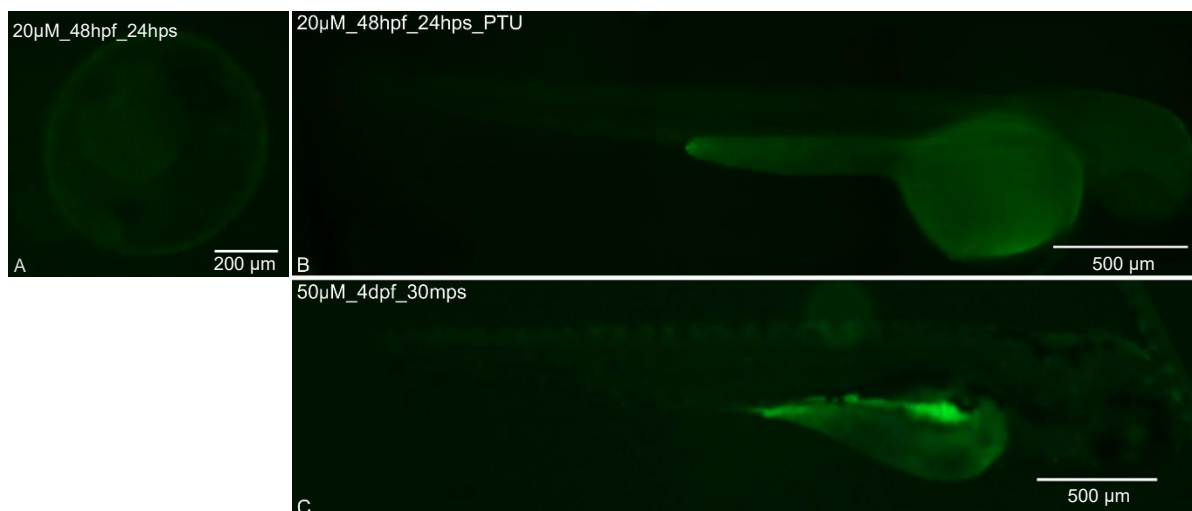
Akumulaciju fluorescentne boje berberin (Berb) promatrala sam na filteru za FITC (ekscitacija na 480 nm, emisija na 535 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Vremena izlaganja po starostima embrija prikazana su na Slici 12. Korištene koncentracije bile su 20 i 50 μM .



Slika 12. Uvjeti inkubacije embrija u otopini fluorescentne boje Berb. hpf = engl. *hours post fertilisation*, sati poslije fertilizacije - starost embrija; hps = engl. *hours post staining*, sati poslije dodatka boje - vrijeme izlaganja.

Prema starosti embrija, akumulacija boje Berb pri 48 hpf uočila se slabo samo u žumanjčanoj vreći (Slika 13 B). Berb je prolazio kroz korion te se također slabo akumulirao u žumanjčanoj vreći (Slika 13 A). Pri 72 hpf signal je ostao isti, dok se pri 96 hpf uočio intenzivan signal u novonastalom probavilu (Slika 13 C) te izbacivanje boje u medij.

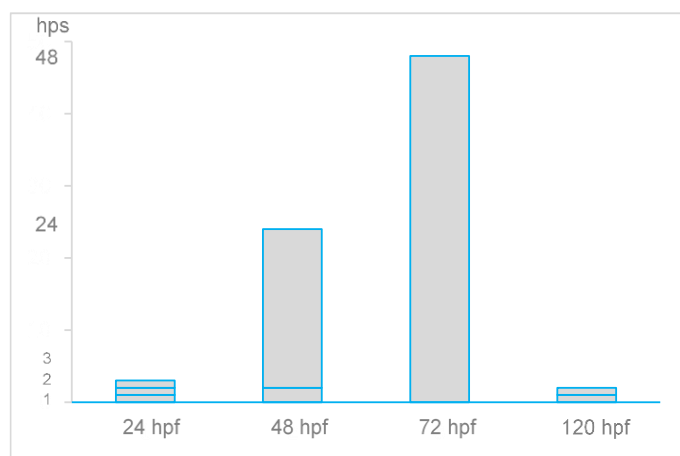
Prema dužini inkubacije, intenzitet signala je bio podjednak. Pigmentiranost embrija nije utjecala na razliku u vidljivosti i intenzitetu signala. Također, promjena koncentracije nije uzrokovala veliku razliku u intenzitetu signala. Signal žumanjčane vreće bio je niskog intenziteta, dok se signal velikog intenziteta pojavio s nastankom probavila.



Slika 13. Akumulacija fluorescentne boje Berb u embrijima zebrice s korionom (A) i bez koriona (B i C). Na slici B signal se nalazi u žumanjčanoj vreći, a na slici C pojavljuje se jaki signal u probavilu.

3.2.1.3. Akumulacija spoja rodamin 123

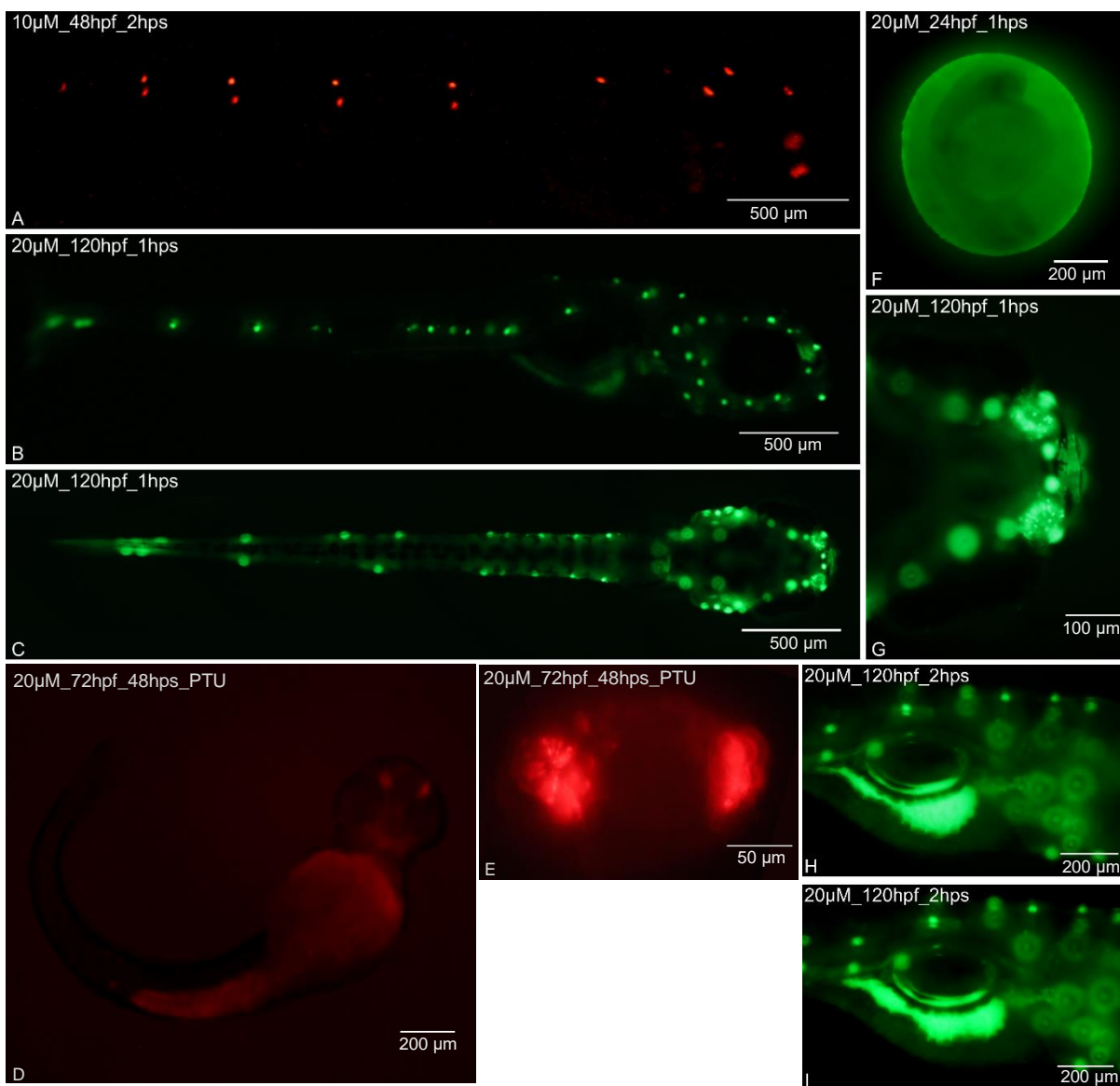
Akumulaciju fluorescentne boje rodamin 123 (Rh123) promatrala sam na mikroskopskoj lupi uz adapter za gledanje fluorescencije *Green* (NIGHTSEA) (ekscitacija 510-540 nm, emisija 600 nm) te na *Texas Red* (ekscitacija 560 nm, emisija 635 nm) i filteru za FITC (ekscitacija 480 nm, emisija 535 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Vremena izlaganja po starostima embrija prikazana su na Slici 14. Korištene koncentracije bile su 0.1, 1, 5, 10 i 20 μM .



Slika 14. Uvjeti inkubacije embrija u otopini fluorescentne boje Rh123. hpf = engl. *hours post fertilisation*, sati poslije fertilizacije - starost embrija; hps = engl. *hours post staining*, sati poslije dodatka boje - vrijeme izlaganja.

Prema starosti embrija, akumulacija boje Rh123 pri 24 hpf uočila se tek nakon inkubacije od 3 sata i jedino na korionima embrija. Rh123 je slabo prolazio kroz korion, što se uočilo kao izostanak akumulacije boje unutar embrija (Slika 15 F). Kod embrija starosti 48 hpf boja se najviše akumulirala u neuromastima i olfaktornom epitelu (Slika 15 A). Signali tih dijelova tijela bili su prisutni i pri 120 hpf, gdje su se uočili i novonastali parovi neuromasta (Slike 15 B i C). Također, pojavio se i signal iz tek nastalog probavila te se uočila peristaltika (Slika 15 H i I).

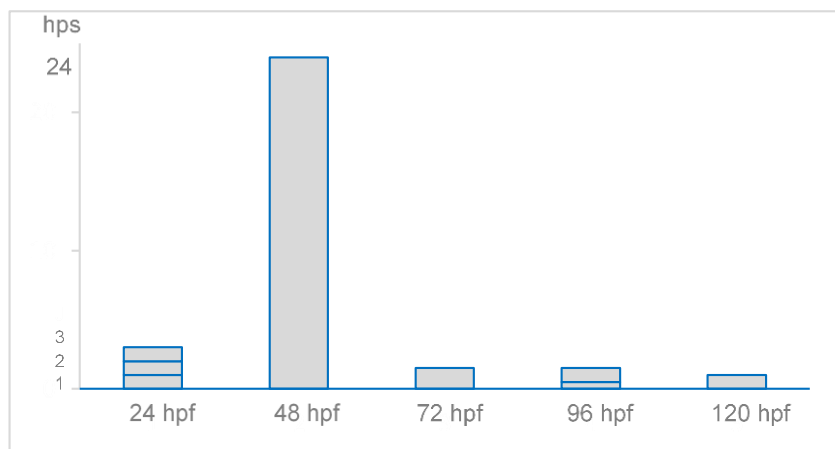
Prema dužini inkubacije, intenzitet signala jako se smanjio nakon inkubacija od 24 h i 48 h (Slika 15 D). Potpuno su nestali signali neuromasta, dok se signal olfaktornog epitela smanjio (Slika 15 E), a pojavio se također slab signal u žumanjčanoj vreći. Također, povećalo se fluorescentno obojenje medija zbog izbacivanja boje. Također, duga inkubacija je loše djelovala na embrije koji su imali savijen oblik tijela (Slika 15 D). Osim dugih inkubacija, intenzitet akumulacije boje u neuromastima i olfaktornom epitelu je bio jednak za sve promatrane starosti embrija i kratke inkubacije. Na embrijima starosti 120 hpf mogle su se jasno vidjeti izdužene kružno poredane stanice olfaktornog epitela (Slika 15 G). Pigmentiranost embrija nije utjecala na razliku u vidljivosti i intenzitetu signala. Intenzitet signala bio je proporcionalan korištenoj koncentraciji boje. Koncentracije 0.1 i 1 μM su bile preniske za vidljivost signala.



Slika 15. Akumulacija fluorescentne boje Rh123 u embrijima zebrice s korionom (F) i bez koriona (A-I). Jako obojenje neuromasta i olfaktornog epitela prikazano je na A-C. Peristatika probavila prikazana je na H i I.

3.2.1.4. Akumulacija spoja rodamin B

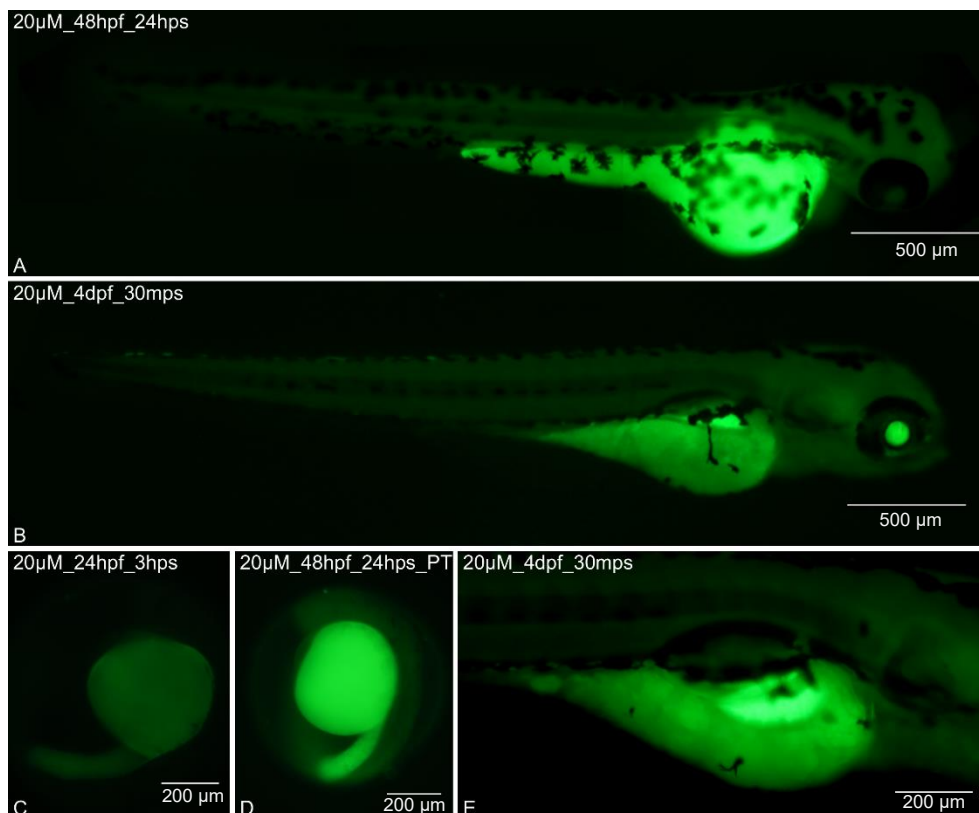
Akumulaciju fluorescentne boje rodamin B (RhB) promatrala sam na filteru za FITC (ekscitacija 480 nm, emisija 535 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Vremena izlaganja po starostima embrija prikazana su na Slici 16. Korištene koncentracije bile su 10 i 20 μM.



Slika 16. Uvjeti inkubacije embrija u otopini fluorescentne boje RhB. hpf = engl. *hours post fertilisation*, sati poslije fertilizacije - starost embrija; hps = engl. *hours post staining*, sati poslije dodatka boje – vrijeme izlaganja.

Prema starosti embrija, akumulacija boje RhB pri 24 hpf uočila se već nakon sat vremena, u žumanjčanoj vreći (Slika 17 C). RhB je lako prolazio kroz korion (Slike 17 C i D). Pri 48 hpf uočio se i slabi signal u očnoj leći, čiji se intenzitet sa starosti embrija povećao (Slika 17 A u odnosu na B). Pri 4 dpf uočio se signal u novonastalom probavilu i leći (Slike 17 B i E).

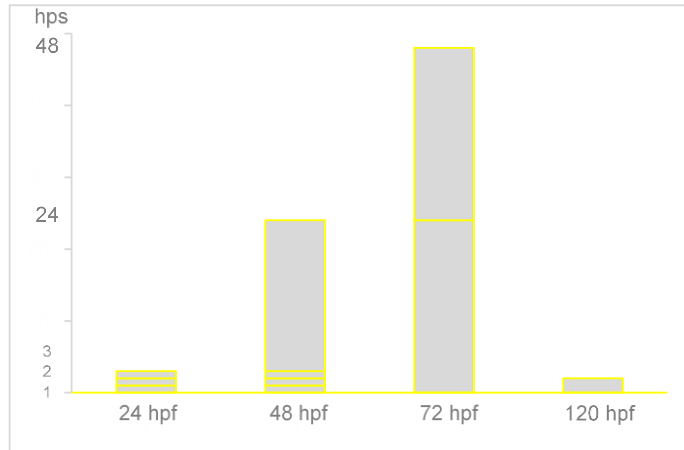
Prema dužini inkubacije, intenzitet signala pojačao se što je vrijeme inkubacije bilo duže (Slika 17 D u odnosu na C). Pigmentiranost embrija nije utjecala na razliku u vidljivosti i intenzitetu signala. Također, koncentracijama 10 i 20 μM nastao je signal podjednakog intenziteta.



Slika 17. Akumulacija fluorescentne boje RhB u embrijima zebrice s korionom (C i D) i bez koriona (A-E). Na svim slikama je prikazano obojenje žumanjčane vreće, a na slikama B i E i probavila.

3.2.1.5. Akumulacija spoja lucifer žuto

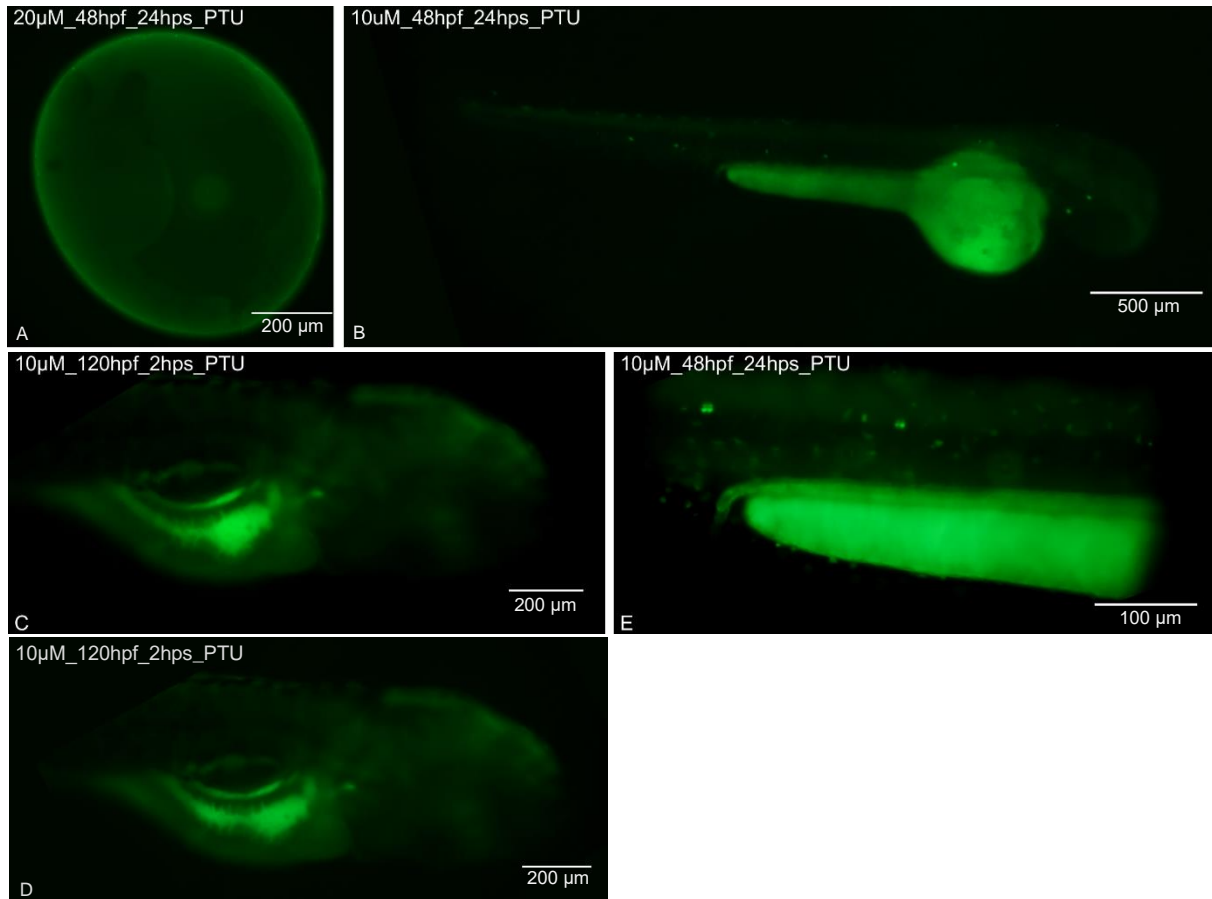
Akumulaciju fluorescentne boje lucifer žuto (LY) promatrala sam na mikroskopskoj lupi uz adapter za gledanje fluorescencije *Royal Blue* (NIGHTSEA) (ekscitacija 440-460 nm, emisija 500 nm) te na filteru za FITC (ekscitacija 480 nm, emisija 535 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Vremena izlaganja po starostima embrija prikazana su na Slici 18. Korištene koncentracije bile su 10, 20, 100 i 200 µM.



Slika 18. Uvjeti inkubacije embrija u otopini fluorescentne boje LY. hpf = engl. *hours post fertilisation*, sati poslije fertilizacije - starost embrija; hps = engl. *hours post staining*, sati poslije dodatka boje - vrijeme izlaganja.

Prema starosti embrija, akumulacija boje LY pri 24 hpf uočila se tek nakon inkubacije od 3 sata i jedino na korionima embrija. LY nije prolazio ili je vrlo slabo prolazio kroz korion, što se uočilo kao izostanak akumulacije boje unutar embrija (Slika 19 A). Na starijim dekorioiniziranim embrijima, pri 48 hpf uočila se akumulacija boje, najviše u žumanjčanoj vreći i tubulu pronefrosa, a vrlo slab signal vidio se u neuralnoj cijevi (Slika 19 B). Vidljiv je bio tok boje kroz tubul pronefrosa i izbacivanje kroz kloaku (Slika 19 E). Također, kod embrija starosti 96 i 120 hpf pojavio se jak signal tek nastalog probavila te se uočila peristaltika (Slike 19 C i D).

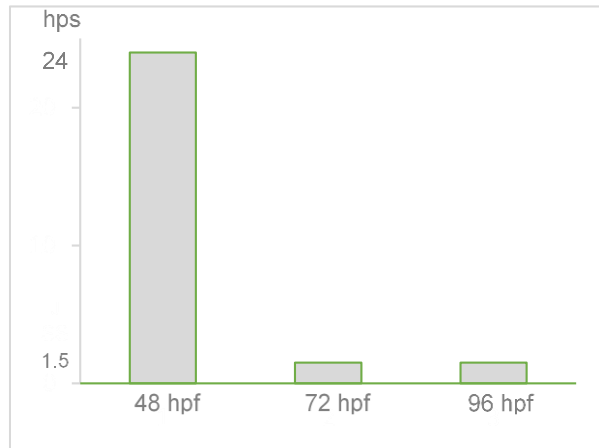
Prema dužini inkubacije, intenzitet signala nije se znatno pojačavao što je vrijeme inkubacije bilo duže. Također, intenzitet obojenja se smanjivao nakon vrlo dugih inkubacija od 48 h, a povećavalo se fluorescentno obojenje medija zbog izbacivanja boje kroz kloaku. Pigmentiranost embrija nije utjecala na razliku u vidljivosti i intenzitetu signala. Koncentracije 100 i 200 μM su bile previsoke jer, osim jakog intenziteta signala, medij je bio jako obojen što je uzrokovalo preveliko pozadinsko obojenje prilikom mikroskopiranja.



Slika 19. Akumulacija fluorescentne boje LY u embrijima zebrice s korionom (A) i bez koriona (B-E). Jako obojenje žumnjčane vreće te izbacivanje boje tubulom pronefrosa kroz kloaku prikazano je na B i E. Peristatika probavila prikazana je na C i D.

3.2.1.6. Akumulacija spoja 2,7-diklorofluorescein

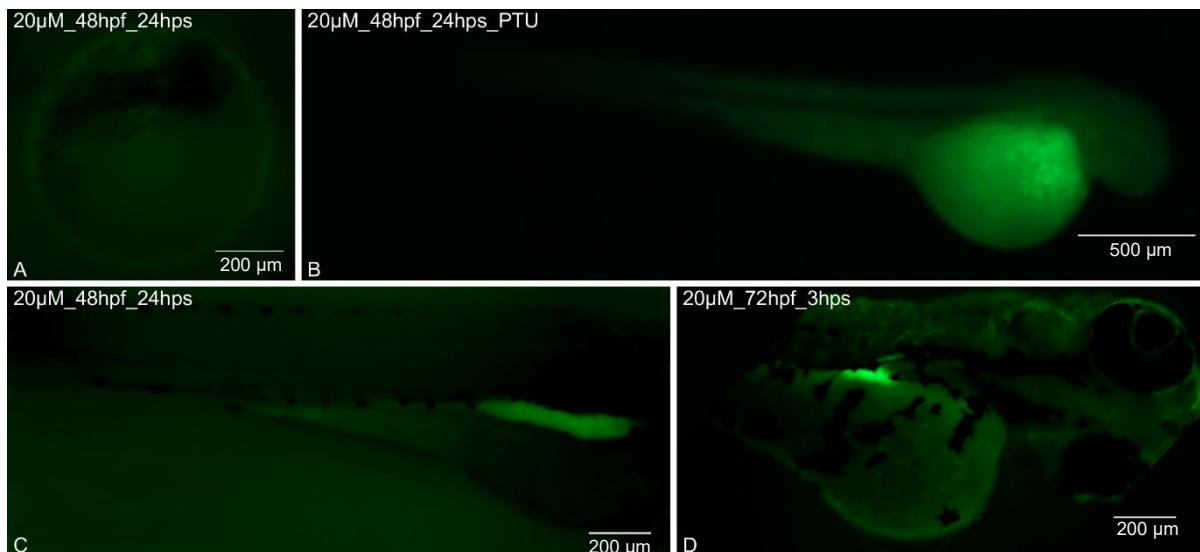
Akumulaciju fluorescentne boje 2,7-diklorofluorescein (2,7-dClF) promatrala sam na filteru za FITC (ekscitacija 480 nm, emisija 535 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Vremena izlaganja po starostima embrija prikazana su na Slici 20. Korištene koncentracije bile su 20 i 50 μM .



Slika 20. Uvjeti inkubacije embrija u otopini fluorescentne boje 2,7-dCIF. hpf = engl. *hours post fertilisation*, sati poslije fertilizacije - starost embrija; hps = engl. *hours post staining*, sati poslije dodatka boje - vrijeme izlaganja.

Prema starosti embrija, akumulacija boje 2,7-dCIF pri 48 hpf uočila se u žumanjčanoj vreći (Slika 21 B) i bubregu (Slike 21 C i D). Vidjelo se i izbacivanje boje kroz kloaku. Signal žumanjčane vreće bio je najjači kod embrija te starosti. 2,7-dCIF nije prolazio ili je vrlo slabo prolazio kroz korion, što se uočilo kao izostanak akumulacije boje unutar embrija (Slika 21 A). Pri 96 hpf uočio se i signal probavnog sustava i peristaltika.

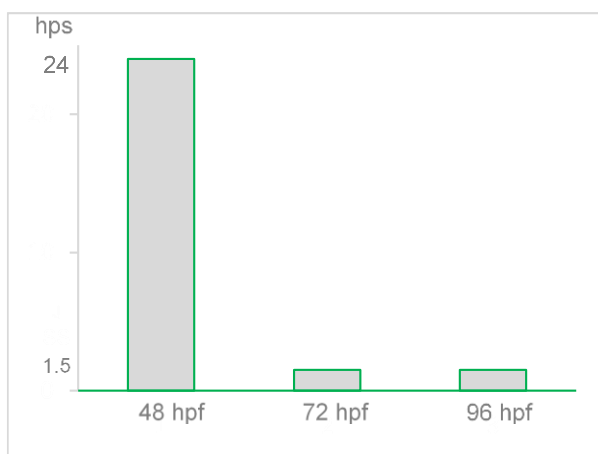
Prema dužini inkubacije, intenzitet signala je bio podjednak. Međutim, obojenje medija bilo je prisutno već i pri kratkim inkubacijama, a vrlo intenzivno je postalo pri inkubaciji od jednog dana, što je uzrokovalo preveliko pozadinsko obojenje prilikom mikroskopiranja. Pigmentiranost embrija je utjecala na vidljivost signala bubrega i intenzitet signala žumanjčane vreće – kod depigmentiranih embrija signal žumanjčane vreće bio je preintenzivan da bi se mogli uočiti tubuli pronefrosa (Slika 21 B u odnosu na C). Promjena koncentracije boje s 10 μM na 20 μM nije uzrokovala veliku razliku u intenzitetu signala.



Slika 21. Akumulacija fluorescentne boje 2,7-dCIF u embrijima zebrice s korionom (A) i bez koriona (B-D). Na slici B prikazano je obojenje žumanjčane vreće, a na slikama C i D ističe se signal u bubregu.

3.2.1.7. Akumulacija spoja 5-karboksifluorescein

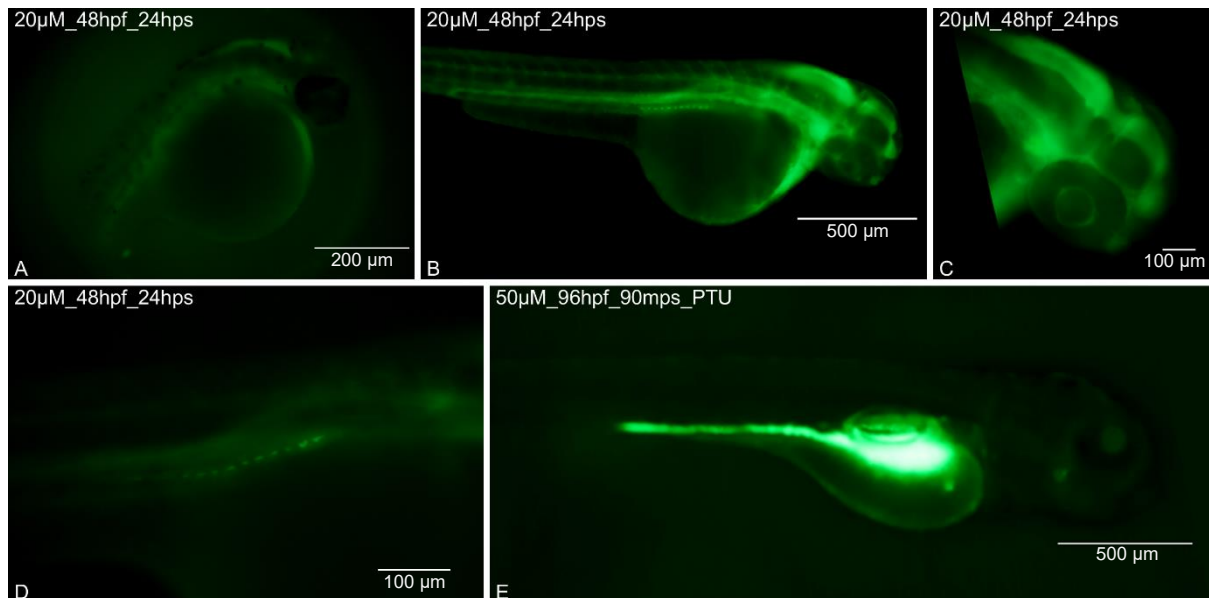
Akumulaciju fluorescentne boje 5-karboksifluorescein (5-CF) promatrala sam na filteru za FITC (ekscitacija 480 nm, emisija 535 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Vremena izlaganja po starostima embrija prikazana su na Slici 22. Korištene koncentracije bile su 20 i 50 μM .



Slika 22. Uvjeti inkubacije embrija u otopini fluorescentne boje 5-CF. hpf = engl. *hours post fertilisation*, sati poslije fertilizacije - starost embrija; hps = engl. *hours post staining*, sati poslije dodatka boje - vrijeme izlaganja.

Prema starosti embrija, akumulacija boje 5-CF pri 48 hpf najviše se uočila na uzdužnim mišićima embrija, a slabiji signal također se nalazio u drugim mišićima po tijelu (Slike 23 B i C). Također, uočile su se i točkaste nakupine signala na mjestima proksimalnih tubula (Slike 23 B i D). 5-CF je prolazio kroz korion te se akumulirao u istim strukturama (Slika 23 A). Međutim, kod embrija starosti 72 hpf i 96 hpf izgubio se specifičan uzorak signala. Tada se signal detektirao samo slabo u žumanjčanoj vreći i očnoj leći te intenzivno u probavilu (Slika 23 E).

Prema dužini inkubacije, intenzitet signala je bio podjednak. Jak signal vidio se već čak 90 mps. Također, pigmentiranost embrija nije utjecala na vidljivost i intenzitet signala. Promjena koncentracije boje s 20 μM na 50 μM uzrokovala je proporcionalnu razliku u intenzitetu signala. Koncentracija 50 μM uzrokovala je prejaki signal.

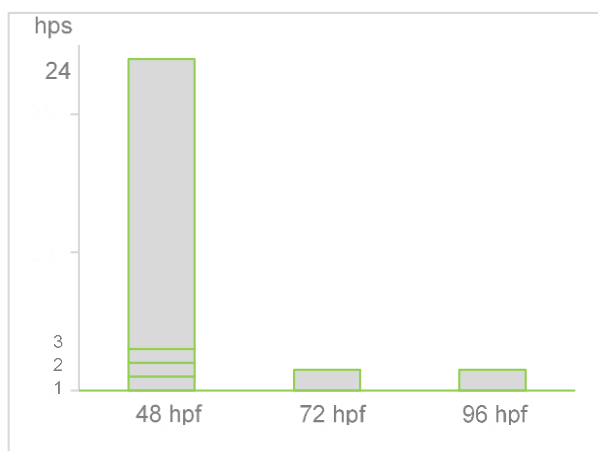


Slika 23. Akumulacija fluorescentne boje 5-CF u embrijima zebrice s korionom (A) i bez koriona (B-E). Na slikama B i C prikazano je obojenje mišća, a na slici E jako je obojano probavilo.

3.2.1.8. Akumulacija spoja 6-karboksifluorescein

Akumulaciju fluorescentne boje 6-karboksifluorescein (6-CF) promatrala sam na mikroskopskoj lupi uz adapter za gledanje fluorescencije *Green* (NIGHTSEA) (ekscitacija 510-540 nm, emisija 600 nm) te na filteru za FITC (ekscitacija 480 nm, emisija 535 nm) invertnog

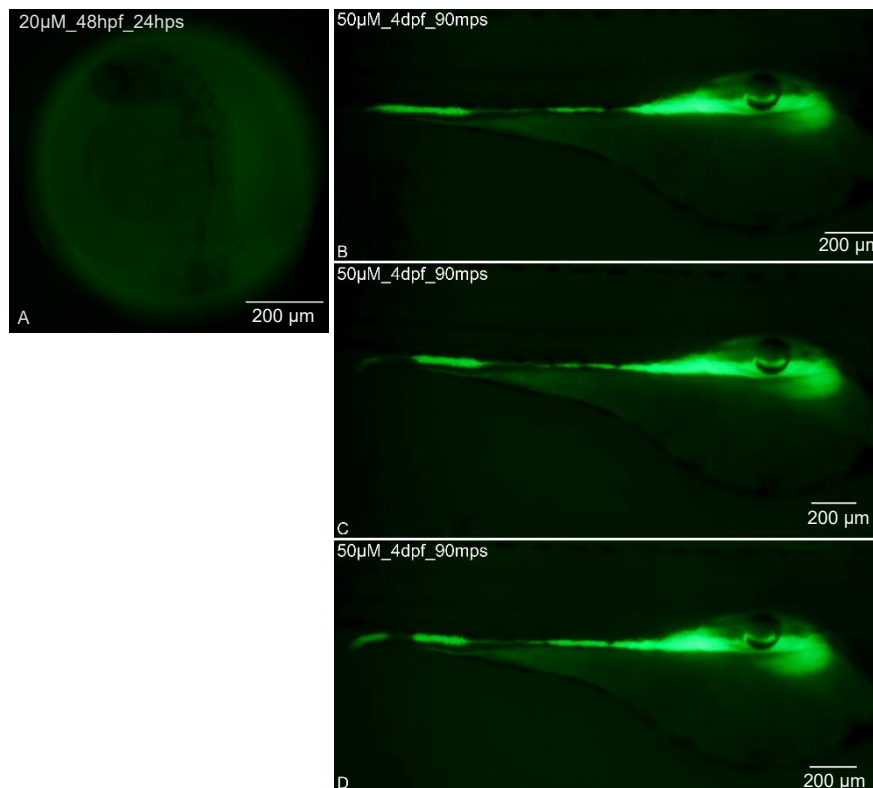
fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Vremena izlaganja po starostima embrija prikazana su na Slici 24. Korištene koncentracije bile su 5, 10, 20 i 50 μM .



Slika 24. Uvjeti inkubacije embrija u otopini fluorescentne boje 6-CF. hpf = engl. *hours post fertilisation*, sati poslije fertilizacije - starost embrija; hps = engl. *hours post staining*, sati poslije dodatka boje - vrijeme izlaganja.

Prema starosti embrija, akumulacija boje 6-CF pri 48 hpf uočila se slabo samo u žumanjčanoj vreći. 6-CF nije prolazi ili je vrlo slabo prolazio kroz korion, što se uočilo kao izostanak akumulacije boje unutar embrija (Slika 25 A). Pri 72 hpf signal je ostao isti, dok pri 96 hpf uočio se intenzivan signal u novonastalom probavilu. Prisutna je bila i peristaltika (Slike 25 B-D).

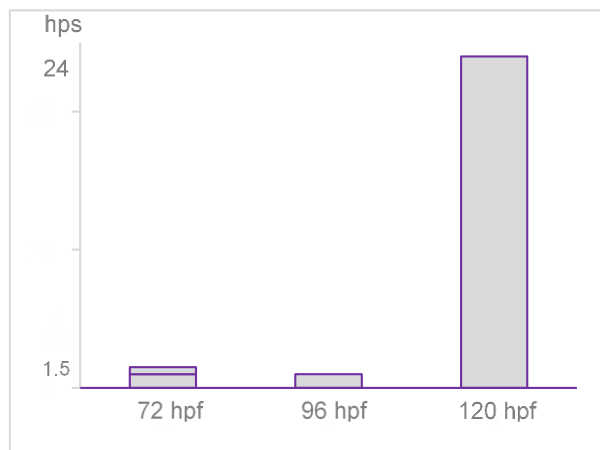
Prema dužini inkubacije, intenzitet signala je bio podjednak. Pigmentiranost embrija nije utjecala na razliku u vidljivosti i intenzitetu signala. Također, promjena koncentracije nije uzrokovala veliku razliku u intenzitetu signala. Signal žumanjčane vreće bio je niskog intenziteta, dok signal velikog intenziteta se pojavio s nastankom probavila. Uočeno je izbacivanje boje kroz probavilo te je zbog toga medij bio fluorescentan.



Slika 25. Akumulacija fluorescentne boje 6-CF u embrijima zebrice s korionom (A) i bez koriona (B-D). Na slikama B-D prikazana je peristaltika probavila.

3.2.1.9. Akumulacija spoja kalcein AM

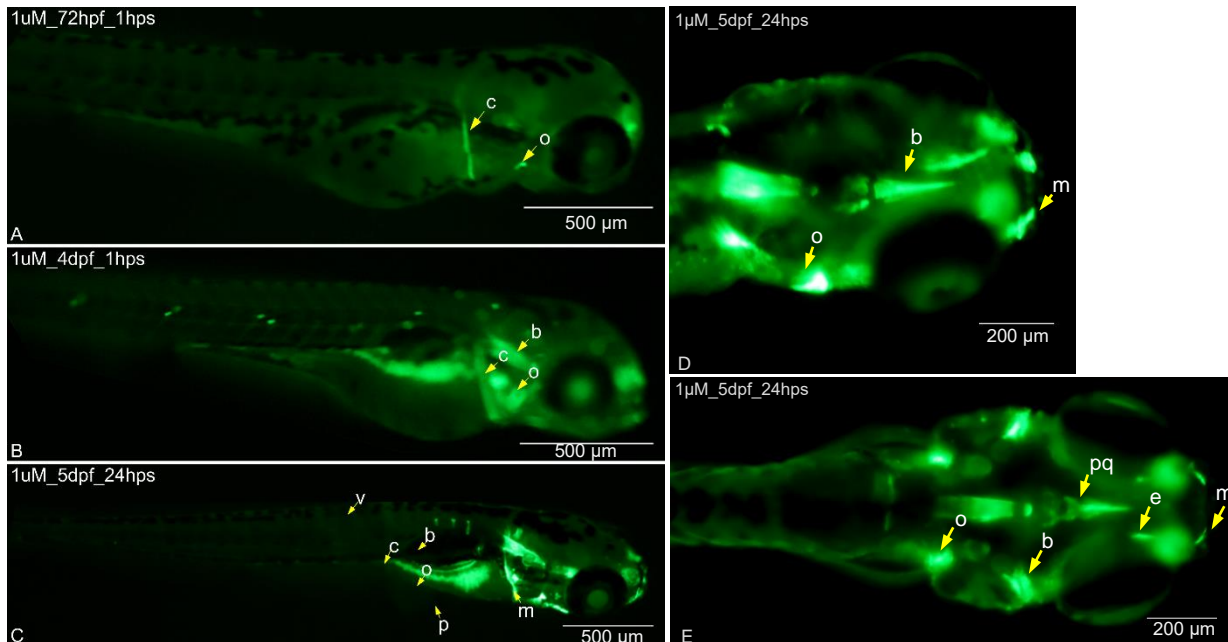
Akumulaciju fluorescentne boje kalcein AM (Kalc-AM) promatrala sam na filteru za FITC (ekscitacija 480 nm, emisija 535 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Vremena izlaganja po starostima embrija prikazana su na Slici 26. Korištena koncentracije bila je 1 μ M.



Slika 26. Uvjeti inkubacije embrija u otopini fluorescentne boje Kalc-AM. hpf = engl. *hours post fertilisation*, sati poslije fertilizacije - starost embrija; hps = engl. *hours post staining*, sati poslije dodatka boje - vrijeme izlaganja.

Prema starosti embrija, akumulacijom boje Kalc-AM moglo se vizualizirati okoštavanje skeleta zebriće. Pri 72 hpf uočile su se koštane strukture između glave i trupa, cleithrum, te začetak operculuma (Slika 27 A). Pri 96 hpf nastale su i branhiostegmalne kosti kod mjesta gdje su se kasnije razvile škrge (Slika 27 B). Pri 120 hpf, kada se zebrića počinje hraniti, razvila se čeljust (mandibula) te parasfenoidna kost u ustima. Također se uočila i palatokvadratna kost na vrhu lubanje te entoptergoidne kosti uz nju (Slike 27 C-E). Tada su se počeli stvarati i prvi kralješci (Slika 27 C).

Prema dužini inkubacije, intenzitet signala je bio podjednak. Pigmentiranost embrija nije utjecala na razliku u vidljivosti i intenzitetu signala. Uz kosti, signal se uočio i u probavilu embrija nakon 4 dpf (Slika 27 C) te u olfaktornom epitelu već od 72 hpf, kao i u leći (Slika 27 B).

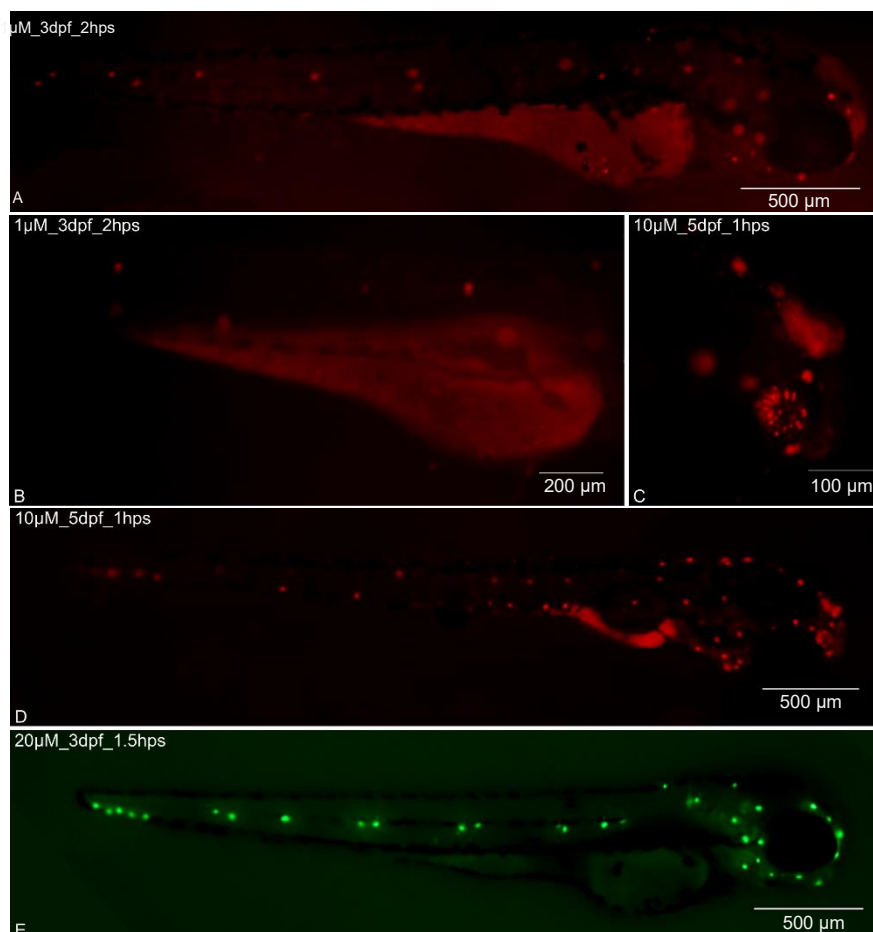


Slika 27. Akumulacija fluorescentne boje Kalc-AM u embrijima zebrice. b = branhiostegmalna kost, c = cleithrum, e = entoptergoidna kost, m = mandibula, o = operkulum, p = parasfenoidna kost, pq = palatokvadratna kost, v = vertebra (kralježak).

3.2.2. Inkubacija embrija zebrice genotipa Oct1 KO fluorescentnim bojama

Akumulaciju fluorescentnih boja ASP+ i Rh123 promatrala sam na filteru za *Texas Red* (ekscitacija 560 nm, emisija 635 nm) i FITC (ekscitacija 480 nm, emisija 535 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Koncentracijama 1 i 10 μM boje ASP+ inkubirani su Oct1 KO embriji starosti 3 i 5 dpf tijekom 1 i 2 h. Bojom Rh123 koncentracije 20 μM inkubirani su Oct1 KO embriji starosti 3 dpf tijekom 1.5 h.

Dobiveni rezultati akumulacije boje ASP+ prikazani su na Slikama 28 A-D, a boje Rh123 na Slici 28 E. Prema starosti embrija, pri 3 dpf, ASP+ se najviše akumulirao u neuromastima, žumanjčanoj vreći i olfaktornom epitelu (Slika 28 A). Uočio se izostanak većeg intenziteta signala u dorzalnom području žumanjčane vreće gdje se nalazi bubreg (Slika 28 B). Signali neuromasta i kružno poredanih izduženih stanica olfaktornog epitela (Slika 28 C) su ostali prisutni i pri 5 dpf, a pojavio se intenzivan signal u novonastalom probavilu (Slika 28 D). Boja Rh123 najviše se akumulirala u neuromastima i olfaktornom epitelu (Slika 28 E).



Slika 28. Akumulacija fluorescentnih boja ASP+ (A-D) i Rh123 (E) u embrijima zebrice genotipa Oct KO. Obojenje žumanjčane vreće uz izostanak signala iz bubrega prikazano je na B, a obojenje olfaktornog epitela na C.

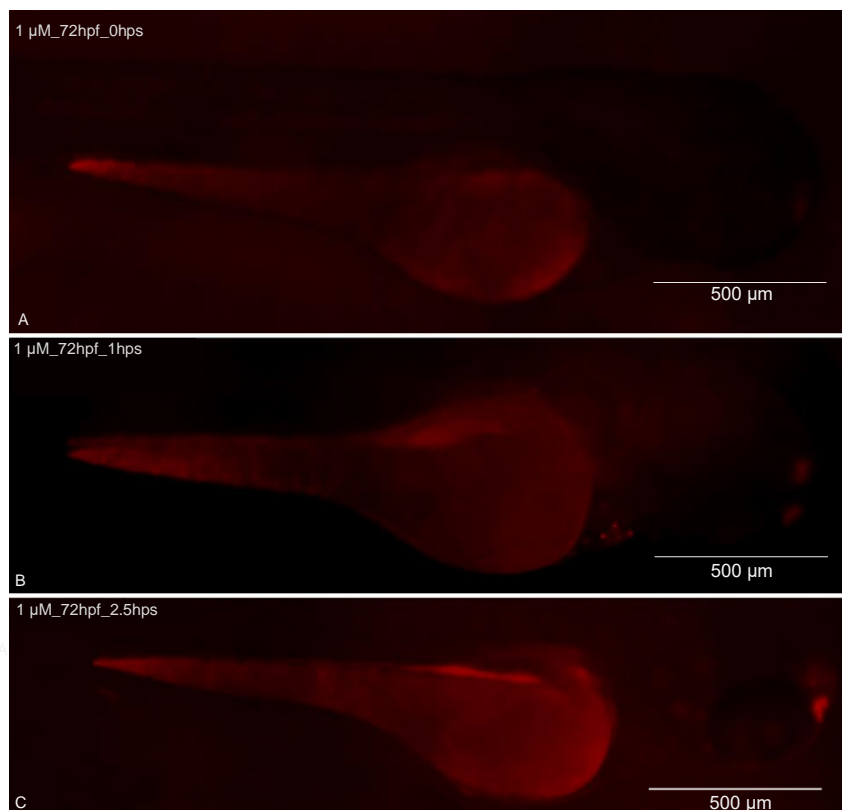
3.2.3. Mikroinjektiranje žumanjčane vreće embrija zebrice fluorescentnim bojama

Akumulaciju fluorescentnih boja ASP+ i LY nakon mikroinjektiranja embrija zebrica promatrala sam na filteru za *Texas Red* (ekscitacija 560 nm, emisija 635 nm) i FITC (ekscitacija 480 nm, emisija 535 nm) invertnog fluorescentnog mikroskopa (Motic AE31E). Koncentracije boja bile su 1 i 10 μM , a starost embrija bila je 3 dpf. Akumulaciju signala promatrala sam odmah nakon injektiranja (0 hps) te u vremenskim intervalima do 2.5 hps.

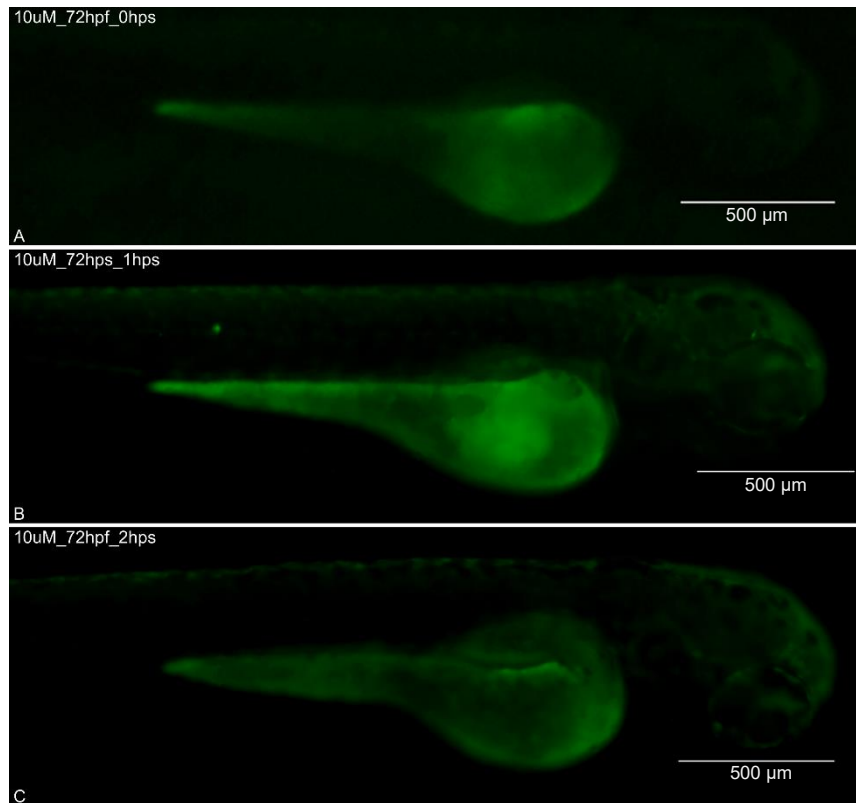
Odmah nakon mikroinjektiranja, signal boje ASP+ bio je vidljiv po cijeloj žumanjčanoj vreći (Slika 29 A). Sat vremena kasnije, signal se pojavio i u bubregu i olfaktornom epitelu (Slika

29 B), a intenzitet signala u tim dijelovima tijela se povećao nakon 2 hps (Slika 29 C). Signal u žumanjčanoj vreći ostao je prisutan tijekom cijelog vremena promatranja.

Odmah nakon mikroinjektiranja, signal boje LY bio je vidljiv po cijeloj žumanjčanoj vreći (Slika 30 A). Signal je ostao na tom istom mjestu i prilikom sljedećih promatranja u istom intenzitetu (Slike 30 B i C).



Slika 29. Akumulacija fluorescentne boje ASP+ u embrijima zebrice nakon mikroinjektiranja. Signal se prvo uočava u žumanjčanoj vreći (A), a zatim i u bubregu i olfaktornom epitelu (B i C)..



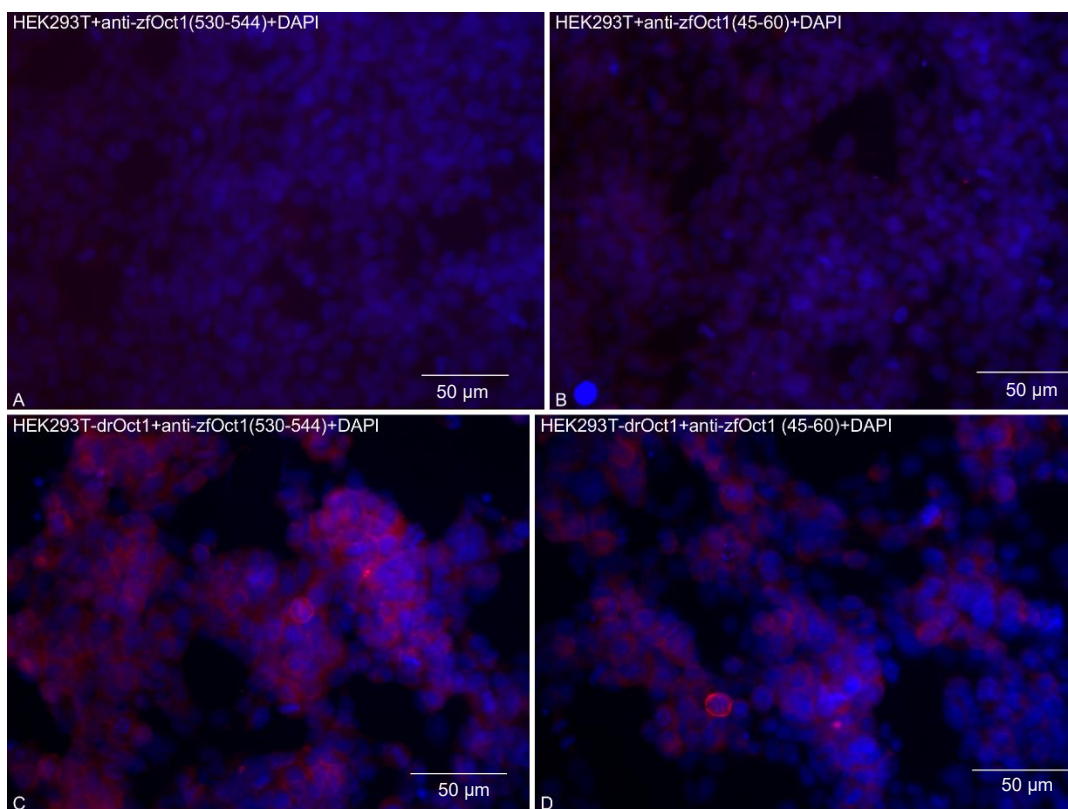
Slika 30. Akumulacija fluorescentne boje LY u embrijima zebrice nakon mikroinjektiranja. Signal se uočava u žumanjčanoj vreći tijekom svih faza promatranja (A, B i C).

3.3. Imunofluorescencijske metode

3.3.1. Unutarstanična lokalizacija membranskog transportera Oct1

Lokalizacija membranskog transportera Oct1 na membranama stanica potvrđena je imunocitokemijskom analizom na stabilnoj staničnoj liniji HEK293T-drOct1. U toj analizi prvi put su upotrebljena antitijela za Oct1, anti-zfOct1 (530-544 ak) i anti-zfOct1 (45-60 ak) (Slike 31 C i D). Specifičnost antitijela, tj. nedostatak nespecifičnog vezanja, potvrđena je nedostatkom signala pri provedbi istog postupka na kontrolnim stanicama HEK293T (Slike 31 A i B). Iako su oba antitijela specifična za Oct1, prema prisutnosti i intenzitetu signala antitijelo anti-zfOct1 (530-544) je pokazalo veću mogućnost prepoznavanja i pravilnog vezanja za Oct1, stoga je ono pogodnije za buduća imunofluorescencijska istraživanja (Slika 31 C). Signal se nije vidio na svim stanicama jer

stanična linija HEK293T-drOct1 ima tendenciju rasta u nakupinama, stoga antitijela nisu mogla doći do svih stanica.

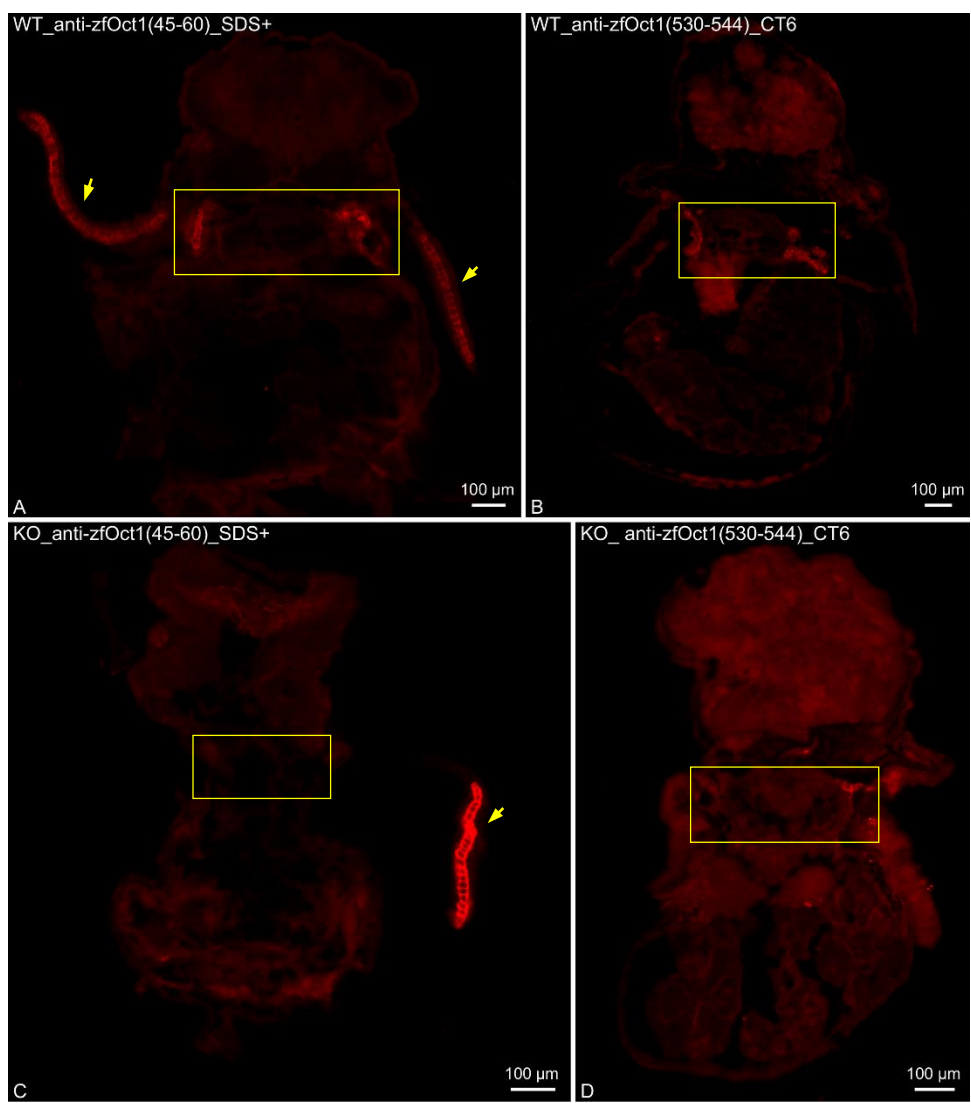


Slika 31. Unutarstanična lokalizacija proteina Oct1. Imunocitokemijska analiza je provedena s primarnim antitijelima anti-zfOct1 (530-544 ak) (A i C) i anti-zfOct1 (45-60 ak) (B i D) te sekundarnim IgG antitijelom konjugiranim s fluoroforom CY3 (crveno), na stanicama HEK2937-drOct1 (C i D) te kontrolnim stanicama HEK293T (A i B). Jezgre su obojane plavo (DAPI).

3.3.2. Tkivna lokalizacija membranskog transportera Oct1 u ličinkama zebrice

Optimizacijom uvjeta za povratak epitopa proteina Oct1 odabrani su najbolji imunohistokemijski uvjeti, SDS+ i CT6, koji su korišteni u daljnjem radu. Detektiranjem tkivne ekspresije transportera Oct1 pomoću specifičnih antitijela, anti-zfOct1(45-60 ak) i anti-zfOct1(530-544 ak), uočila se razlika između signala na zebricama genotipa WT i Oct1 KO. Na krioprerezu WT zebrica (Slike 32 A i B) signal se nalazio na membranama tubula pronefrosa, označeno žutim kvadratom. Također, signal je bio prisutan i u mebranama hondrocita pektoralnih peraja, označeno žutom strelicom, različitog intenziteta u promatranim uvjetima (pri uvjetu SDS+

jače nego pri CT6). Specifičnost vezanja antitijela provjerena je usporebom lokalizacije tih signala sa signalima na uzorcima Oct1 KO zebrića (Slike 32 C i D). U tom slučaju u tim zebrićima ne bi trebalo doći do ekspresije proteina Oct1, stoga se signal ne bi trebao nalaziti na mjestu bubrega. Taj rezultat je i dobiven – u uzorcima krioprereza Oct1 KO zebrića nema signala na membranama pronefrosa (pretpostavljeno mjesto tubula označeno je žutim kvadratom). Međutim, signal je prisutan na membranama hondrocita pektoralnih peraja. To znači da se u tom slučaju antitijelo nije vezano na protein Oct1, nego na neki epitop slične strukture koji se nalazi u membranama hrskavičnog tkiva.



Slika 32. Tkivna lokalizacija lokalizacija proteina Oct1. Imunocitokemijska analiza je provedena s primarnim antitijelima anti-zfOct1 (45-60) (A i C) i anti-zfOct1 (530-549) (B i D) te sekundarnim IgG antitijelom konjugiranim s fluoroforom CY3 (crveno), na krioprerezima zebrica genotipa WT (A i B) i Oct1 KO (C i D). Uvjeti imunohistokemijske analize bili su SDS+ i CT6. Starost zebrica bila je 4 dpf. Kvadratom je označeno mjesto tubula bubrega, a strelicama pectoralne peraje.

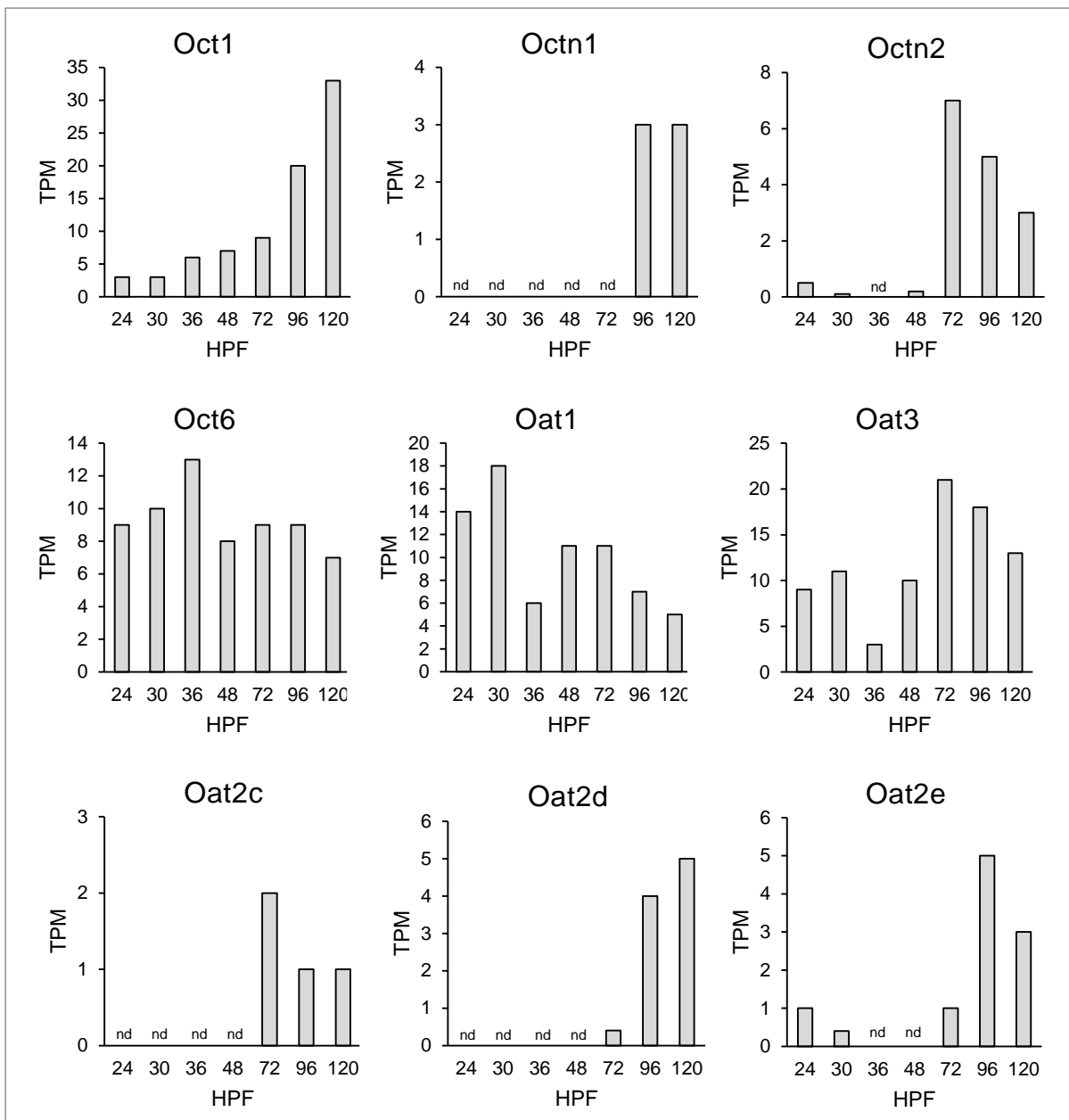
3.4. Ekspresijski profili membranskih transportera zebrice po embrionalnim i ličinačkim stadijima

Analizom ekspresijskih profila membranskih transportera zebrica *in silico* dobila sam prikaz ekspresije mRNA devet membranskih transportera tijekom sedam embrionalnih i ličinačkih stadija. Ekspresije su izražene kao TPM (engl. *transcripts per million*), broj transkripata traženog gena u milijun molekula RNA u uzorku.

Kao što se vidi na Slici 33, ekspresija transportera Oct1 povećava se od prvog do petog dana razvoja embrija zebrice, za čak 11 puta, od 3 do 33 TPM. Najveće povećanje događa se između trećeg i četvrtog dana, od 9 TPM na 20 TPM. Za razliku od njega, nijedan drugi analizirani transporter nema sličan profil ekspresije. Ekspresija transportera Octn, Octn2, Oat2c, Oat2d i Oat2e je vrlo mala ili uopće nije detektirana tijekom prvih 48 sati razvoja embrija. Transporteri Oat1 i Oat3 imaju sličan profil ekspresije. Imaju veliku ekspresiju tijekom prvog dana, nakon koje slijedi nagli pad ekspresije 36 hpf te ponovan rast razine ekspresije do 72 hpf i naposljetku pad do 5 TPM za Oat1 i 13 TPM za Oat3. Za razliku od njih, najveća ekspresija transportera Oct6 upravo je 36 hpf, dok u ostalim promatranim vremenskim točkama je podjednake vrijednosti, oko 8 TPM.

Uspoređujući najveće razine ekspresije unutar promatranog vremenskog okvira, transporter Oct1 ima najvišu ekspresiju od svih analiziranih transportera, 33 TPM. Nakon njega, transporteri s najvećom ekspresijom su Oat3, 21 TPM 72 hpf, i Oat1, 18 TPM 30 hpf. Osim njih. Najmanju ekspresiju ima transporter Oat2c, čija najveća ekspresija je 2 TPM 72 hpf, a ekspresija prilikom ranijih razvojnih vremenima nije zabilježena.

Prema razinama ekspresije pri pojedinom promatranom razvojnom stadiju, 24 hpf i 30 hpf najveću ekspresiju ima Oat1 (14 TPM i 18 TPM), zatim najveću ekspresiju 36 hpf ima Oct6 (13 TPM) te ponovno Oat1 pri 48 hpf (11 TPM). Najveću ekspresiju 72 hpf ima Oat3 (21 TPM), a u daljnjim stadijima transporter s najvećom ekspresijom postaje Oct1 (20 TPM 96 hpf te 33 TPM 120 hpf).



Slika 33. Ekspresijski profili membranskih transporterata porodice Slc22 tijekom embrionalnih i ličinačkih stadija zebriće. HPF = *hours per fertilisation*, TPM = engl. *transcripts per million*, nd = nije detektirano. Podatci su preuzeti iz rada autora White i sur. (2017).

4. RASPRAVA

4.1. Genotipizacija F1 i F2 generacije zebrića mutanata za protein Oct1

Riba zebrića vrlo je pogodan organizam za funkcionalno genetička istraživanja. Metodom editiranja genoma CRISPR/Cas9 stvoreni su mutanti mnogih gena zebriće, uključujući membranskih transportera superporodica ABC (Van Gils i sur. 2018; Lu i sur. 2021) i SLC (Converse i Thomas 2020; Qian i sur. 2020; Byrd Baronio i sur. 2021). U Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković stvoren je KO mutant membranskog transportera Oct1. Delecija u 1. egzonu gena *Oct1* dovela je do preuranjenog STOP kodona te prestanka translacije molekule mRNA (Slika 8), stoga nije došlo do stvaranja normalnog proteina Oct1. Uspješnim stvaranjem i genotipizacijom homozigotne linije mutanta (Slike 9) u kojoj je svaka jedinka deficitarna za protein, može se promatrati njegova biološka funkcija. Kao istraživački model odabrala sam embrije i ličinke zebriće starosti do 5 dpf. Embriogeneza je važna životna faza te su bilo kakve disfunkcije tijekom ranog razvoja organizma povezane s raznim bolestima i štetnim učincima (Chen i sur. 2016). Međutim, fenotipskom karakterizacijom embrija i ličinki zebrića deficitarnih za protein Oct1 (F3 generacija) nije utvrđena razlika u odnosu na jedinke zebrića divljeg tipa. Nisu primijećene promjene u embrionalnom razvoju koje bi dovele do deformacija i letalnosti. Isto je utvrđeno i za zebriće F2 generacije koje su tek dostigle spolnu zrelost (3-4 mjeseca), ali utjecaj manjka proteina Oct1 na starije jedinke tek se mora otkriti.

Uspoređujući učinak deficitarnosti proteina Oct1 na druge modelne organizme, Oct1^{-/-} miševi su također bili vijabilni, zdravi i fertilni te nisu pokazali nikakve očite fenotipske abnormalnosti (Jonker i sur. 2003). Međutim, usporedbom akumulacije i izlučivanja modelnih supstrata transportera u miševima divljeg tipa i Oct1^{-/-} miševima, uočio se poremećen unos tvari u jetru i crijeva. Tetraetilamonij (TEA) se manje nakupljao u jetri pa je u većoj količini bio dostupan izlučivanju bubrezima. Osim toga, došlo je do smanjenja nakupljanja antikancerogenog spoja metajodobenzilguanidina (MIBG, engl. *meta-iodobenzylguanidine*) i neurotoksina 1-metil-4-fenilpiridija (MPP⁺) u jetri (Jonker i sur. 2001). Smanjenje nakupljanja u jetri i bubrezima primijećeno je i za spoj metformin (Wang i sur. 2002), lijek za hiperglikemiju. Nasuprot tome, nije pronađen poremećaj u raspodijeli cimetidina i kolina što upućuje da je homeostaza endogenih organskih tvari strogo regulirana te je vjerojatno došlo do drugih mehanizama transporta (Jonker i sur. 2001). Ti rezultati pokazuju da membranski transporter Oct1 nije ključan za zdravlje i plodnost

miševa, ali da ima važnu ulogu u farmakokinetici određenih kationskih lijekova i toksina, posebno u apsorpciji kationa u jetru i njihovom izravnom izlučivanju u lumen tankog crijeva.

Na tragu ovih saznanja, kod odraslih zebrića može se očekivati promjena akumulacije supstrata i smanjeno izlučivanje probavnim sustavom. Međutim, postoji razlika u tkivnoj ekspresiji zebrićinog transportera Oct1 u odnosu na mišji. Kod oba organizma najveća ekspresija nalazi se u bubregu, a drugi organ po razini ekspresije je jetra, iako je ekspresija transportera Oct1 u jetri miša puno veća nego ekspresija u jetri zebrića (Alnouti i sur. 2005; Mihaljević i sur. 2016). Također, malo podataka o ekspresiji je poznato za ranije stadije. Stoga je prvi uvid o utjecaju nedostatka membranskog transportera Oct1 na embrije i ličinke zebrića napravljen u sklopu ovog rada, uz pomoć fluorescentnih boja.

4.2. Praćenje akumulacije fluorescentnih boja u embrijima zebrića *in vivo*

Za potrebe istraživanja ovog rada prvo je bilo potrebno pripremiti modelne organizme - embrije i ličinke zebrića određene starosti. Jedna od prednosti korištenja zebrića u istraživanjima je upravo njihov brz razvitak. Međutim, to može biti i potencijalni problem kada je potrebno promatrati sve embrije u točno određenom razvojnom stadiju. Između pojedinih embrija postoje varijacije u vremenu potrebnom za dostizanje određenog stadija. Stoga dodavanjem spoja pri određenom vremenu hpf ne mora značiti da će se provesti standardizirano izlaganje svih embrija u istoj fazi razvoja (Ali i sur. 2011). Stoga bi bilo bolje standardizirati starost embrija pomoću razvojnih stadija poput onog autora Kimmel i sur. (1995), ali to bi zahtijevalo pojedinačnu procjenu za svaki embrio, što je vremenski vrlo zahtjevno. Jednostavnija metoda bila bi sinkronizacija mrijesta fizičkim odvajanjem ženki i mužjaka pomoću pregrade koja se uklanja na dan mrijesta te ograničavanjem vremena mrijesta na pola sata (Rosen i sur. 2009). Ta metoda koristi se pri mikroinjektiranju embrija, npr. prilikom metode editiranja genoma CRISPR/Cas9, kada je bitno da embriji budu u jednostaničnom stadiju.

Zatim, za potrebe istraživanja bilo je potrebno unijeti odgovarajuće spojeve u zebriće te pratiti njihovu akumulaciju. Uspoređujući konstante unosa spojeva iz medija kod zebrića ili plazme kod ljudi, unos u zebriće je čak 40 puta veći (Tulasi Kirla i sur. 2018). Ta velika razlika stopa unosa

spojeva u zebriće u odnosu na ljude moguća je zbog „manje“ prepreke. Spojevi teže prelaze crijevni epitel kod ljudi, nego kožu ili škrge ličinki zebrića. Međutim, budući da škržne lamele u ličinki zebriće postaju potpuno funkcionalne tek od 12 do 14 dpf, glavna barijera zebrića iz ovog istraživanja (2-5 dpf) je koža (Rombough, 2002). Također, aktivni transportni mehanizmi mogli bi dodatno pridonijeti većoj apsorpciji ksenobiotika u zebrića.

U ovom radu zebriće su inkubirane ili mikroinjektirane s otopinama devet različitih fluorescentnih boja - poznatih supstrata membranskih transportera i molekula slične strukture. Često se za istraživanja *in vivo* koriste upravo fluorescentni spojevi. Kako bi lokalizacija fluorescentnog signala bila što lakša i preciznija, korišten je spoj feniltiourea za sprječavanje nastanka melanina blokiranjem potrebnih tirozinaza. Iako su embriji i ličinke zebriće sami po sebi većinom prozirni, pozicija pigmentnih stanica može otežavati vidljivost unutarnjih organa npr. bubrega. Međutim, PTU ne utječe samo na tirozinaze, nego i na druge enzime, što ima za posljedicu poremećen rad štitnjače (Elsalini i Rohr 2003), smanjene veličine oka (Li i sur. 2012) te smanjenje pokretljivost i odgađanje izlijeganja što je i uočeno prilikom istraživanja. Također, embriji ostaju depigmentizirani sve dok su izloženi tom spoju, stoga uvijek moraju biti u prilagođenom mediju. Također, treba se paziti na vrijeme dodatka PTU – izlaganje se mora započeti prije formiranja pigmenta (oko 24 hpf) jer ne uklanja već formirani pigment (Karlsson i sur. 2001). Ipak, usprkos svim nedostacima, depigmentizacija putem spoja PTU je vrlo jednostavno rješenje za dobivanje prozirnih embrija unutar kratkog vremena te skoro kod svih tretmana bojama korištenje depigmentiziranih zebrića poboljšalo je vidljivost signala. Nakon interpretacije prikupljenih rezultata, tj. slika signala dobivenih fluorescencijskim mikroskopom, uočeno je da svaka boja ima specifične karakteristike mjesta lokalizacije, mogućnosti prolaska kroz korion, ovisnosti intenziteta obojenja o dužini inkubacije i koncentraciji boje te izbacivanja iz organizma kroz pronefros ili probavni sustav.

Prva prepreka u kontaktu embrija zebrića sa ksenobioticima je korion. Ta troslojna acelularna ovojnica debljine 1.5-2.5 μm obavija embrio do izlijeganja, otprilike 72 hpf. Srednji i unutarnji sloj koriona sadržavaju ravnomjerno raspoređene konusne kanale, međusobno razmaknute 1.5-2.5 μm . Imaju uski promjer, 0.5–0.7 μm , što znači da mogu ograničavati unos spojeva ovisno o njihovoj veličini i naboju (Rawson i sur. 2000). Uz vrlo viskoznu unutrašnjost kanala, značajno se usporava difuzija nanočestica (Lee i sur. 2007). Također, visoke koncentracije

malih molekula poput etanola polako difundiraju kroz korion. Smatra se da je propustan za molekule manje od 4 kDa (Ali i sur. 2011). Sve fluorescentne boje u ovom radu imaju puno manju molekularnu masu, od kojih najveću masu ima kalcein-AM, 622.6 Da, a najmanju berberin, 336.4 Da. Međutim, i drugi parametri poput lipofilnosti i specifičnih molekularnih konformacija utječu na mogućnost prolaska kroz korion (Kais i sur. 2013), kao i vrsta korištenog otapala (Pelka i sur. 2017). U ovom radu, prilikom dodatka u medij E3 boje su bile otopljene u polarnom otapalu DMSO koje brzo prelazi stanične membrane. Štoviše, njegova relativno mala veličina omogućuje prodiranje molekula unutar proteinskih podjedinica, kao što su kanali koriona. Pokazano je da se signal fluorescencije fluoresceina povećava s koncentracijom upotrebljenog DMSO-a, odnosno da koncentracije DMSO-a od 0.1% i 1% smanjuju barijernu funkciju koriona (Kais i sur. 2013). Međutim, utjecaj različite supstituiranosti molekula na unos kroz korion vidljiv je na primjeru 2,7-diklorofluoresceina, čiji se unos nije značajno povećao s povećanjem koncentracije DMSO-a, za razliku od fluoresceina. U ovom radu uočili smo da 2,7-dClF ne prolazi, ili vrlo slabo prolazi, kroz korion (Slika 21 A), kao i boja LY (Slika 19). Sličan primjer razlike u propusnosti koriona za slične molekule su derivati fluoresceina koji su izomeri, 6-CF koji ne prolazi kroz korion (Slika 25), 5-CF koji prolazi (Slika 23) te derivati rodamina, Rh123 (Slika 15) koji ne prolazi i RhB koji prolazi kroz korion (Slika 17). Posebice se kod rodamina uočava velika razlika u postojanju signala u embriju zebrice unutar koriona. Iako su te molekule slične strukture, razlikuju se u polaritetu, funkcionalnim skupinama i strukturnim konfiguracijama, a sve to može biti ključno za distribuciju spoja (Kais i sur. 2013). Iako lako prolazi kroz membrane, glavna prepreka za prijenos DMSO-a u žumanjčanu vreću zebrice je sincitijski sloj žumanjčane vreće. To je ekstraembrionalno sincitijsko tkivo koje ima ključnu ulogu u ranom razvoju zebrice te se degradira u stadiju ličinke (Carvalho i Heisenberg 2010). DMSO prodire u sincitijski sloj žumanjčane vreće, ali ne i u embrio. Stoga DMSO olakšava unos spojeva kroz korion, ali ne i izravni unos u embrio (Kais i sur. 2013).

Od svih spojeva samo se kalcein-AM nije vidljivo akumulirao u žumanjčanoj vreći. Tijekom prvih dana razvoja ribe su potpuno lecitotrofne, hrane se razgradnjom hranjivih sastojaka pohranjenih u žumanjčanoj vreći, koja čini veliki udio mase cijelog embrija (Sant Halbach i sur. 2020). Stoga je bilo za očekivati da će se većina molekula istraživanih spojeva nalaziti u žumanjčanoj vreći. Embrio zebrice u gastrulaciji sadrži oko 50 µg proteina, od kojih je više od 90% sadržano u žumanjčanoj vreći. Primarna hranjiva tvar je glikolipoprotein vitelogenin, a sadrži i ostale složene fosfolipide i glikoproteine, vitamine i ione (Sant i Timme-Laragy 2018). Te hranjive

tvori pakirane su u granule koje su zapravo modificirani lizosomi u kojima se hranjive tvari pohranjuju te po potrebi razgrađuju (Miyares i sur. 2014). Između granula žumanjčane vreće i tijela zebrice nalazi se prethodno spomenuti sincitijski sloj žumanjčane vreće. On pomaže u apsorpciji hranjivih sastojaka žumanjčane vreće (Miyares i sur. 2014). Međutim, sincitijski sloj žumanjčane vreće ima i funkciju barijere, jer ukoliko molekula ne može proći kroz ovaj sloj zadržat će se u žumanjčanoj vreći i neće biti akumulacije u druge dijelove embrija. Moguće je da je to bio slučaj za boje berberin (Slika 13) i 6-karboksifluorescein (Slika 25).

Spojevi se u žumanjčanu vreću unose pasivnim ili aktivnim transportom preko kože koja sadrži nekoliko aktivnih receptora za endocitozu ili pinocitozu. Zbog svoje lipofilnosti, u žumanjčanoj vreći mogu se akumulirati hidrofobni spojevi kojima je embrio izložen. Kao posljedica toga uočava se razlika akumulacije spojeva između žumanjčane vreće i ostatka embrija (Sant i Timme-Laragy 2018). Međutim, sastavi žumanjčane vreće i ostatka embrija mijenjaju se tijekom razvoja pa se mijenjaju i njihova apsorpcijska svojstva. Još nije jasno koji parametri, npr. razvojna faza i fizikalno-kemijska svojstva spojeva, utječu na raspodjelu tvari između medija, žumanjčane vreće i embrionalnog tijela i kako se to može promijeniti tijekom brzog razvoja zebrice (Sant Halbach i sur. 2020). Primjer toga je boja 5-karboksifluorescein koji se tijekom mlađih stadija embrija (do 72 hpf) prvenstveno akumulira u mišićima (Slike 23 A-D), a kasnije se uočava signal samo u žumanjčanoj vreći (Slika 23 E), kao kod boja Berb i 6-CF. Ta vremenska razlika u lokalizaciji spoja 5-CF do sada nije uočena i razjašnjena. Štoviše, karboksifluorescein se često komercijalno prodaje kao smjesa 6-CF i 5-CF. Međutim, iz ovog istraživanja očita je da njihova mala razlika u poziciji karboksilne skupine ima utjecaja na lokalizaciju u organizmu. Potrebno je ponavljanje istraživanja s drugim starosnim skupinama ličinki zebrice i vremenima izlaganja. Moguće je da je upravo dugo vrijeme inkubacije (24 hps) pridonijelo razgradnji ili preraspodijeli spoja u druge dijelove organizma. Za razliku od ostalih spojeva, za nastanak fluorescentnog signala spoja kalceina-AM potrebna je njegova hidroliza citosolnim esterazama. Iako je žumanjčana vreća metabolički aktivna, čini se da ne posjeduje stanice sa citosolnim esterazama, nego samo granule pune hranjivih tvari i drugih enzima za njihovu razgradnju. Stoga signal spoja Kalc-AM nije vidljiv u žumanjčanoj vreći, nego u kostima i olfaktornom epitelu (Slika 27).

Olfaktorni sustav riba koštunjača sličan je kopnenim kralježnjacima, iako strukture izgledaju jednostavnije ili su, u nekim slučajevima, manje organizirane. Kod zebrica, kao i kod

drugih pravih koštunjača, periferne olfaktorne strukture nalaze se dorzalno od očiju, u šupljini prekrivenoj kožom s otvorima za ulazak i izlazak vode (Byrd i Brunjes 1995). Rani razvoj olfaktornog organa zebrića događa se brže nego kod drugih riba. Olfaktorni aksoni dosežu neuralnu cijev već 24 hpf, a 34-36 hpf na glavi se pojavljuju mali prorezi, olfaktorne jamice, koje se 96 hpf vide kao okrugli otvori prekriveni receptorskim cilijama, receptorskim mikrovilima te izbočinama potpornih stanica i dugih kinocilija (Hansen i sur. 1993; Byrd i Brunjes 1995). Te receptorske osjetne stanice olfaktornog epitela detektiraju signal koji se prenosi do olfaktornih bulbosa. Također, prilikom vizualizacije osjetnih dlačnih stanica unutarnjeg uha i bočne linije zebriće, otkriveno je i postojanje olfaktornih štapićastih stanica u olfaktornom epitelu zebriće (Cheung i sur. 2021). To ukazuje na sličnosti strukture neuromasta i olfaktornog epitela koja rezultira vezanjem boje na oba organa, kao što je slučaj s bojama ASP+ (Slika 11 I) i Rh123 (Slika 15 G). Kako su obje boje supstrati transportera Oct1, njegova moguća lokalizacija u olfaktornom epitelu (koji bi se, za razliku od neuromasta, mogao dobro vidjeti na poprečnim krioprerezima) mogla bi se dokazati imunohistokemijski s antitijelom za Oct1. Međutim, takav signal nije uočen, što znači da se Oct1 ne nalazi u olfaktornom epitelu ličinke zebriće stare 4 dpf ili je jednostavno ta struktura oštećena prilikom fiksacije uzoraka, rezanja krioprereza ili imunohistokemijske obrade. S druge strane, prethodno je otkrivena specifična lokalizacija transportera organskih aniona Oat6, također iz porodice Slc22, u olfaktornom epitelu miša (Monte i sur. 2004; Kaler i sur. 2006).

Tijekom inkubacije embrija zebriće s fluorescentnim bojama ASP+ i rodamin 123, uočeni su točkasti signali na glavi i u pravilno razmaknutim parovima uzduž tijela (Slike 11 i 15). To su prethodno spomenuti neuromasti, organi bočne linije koji tvore površinski osjetni sustav vodozemaca i riba. Njihova funkcija je otkrivanje vibracija i dodira po tijelu iz obližnjeg vodenog okruženja, što olakšava otkrivanje predatora, hvatanje plijena i izbjegavanje objekata te omogućava društveno ponašanje. Jedan neuromast je stanična nakupina koja sadrži mehanosenzorne stanice s dlakom (stereocilijom) inervirane aferentnim i eferentnim neuronima i okružene nesenzornim potpornim stanicama (Williams i Holder 2000; Ma i Raible 2009). Ličinke starosti 4 dpf i 5 dpf već imaju 18 neuromasta na glavi i devet na trupu sa svake strane tijela u linijama koje čine bočne linije (Harris i sur. 2003). Taj osjetilni sustav prolazi promjene tijekom postembrionalnog razvoja, koje uključuju dodavanje novih neuromasta i migraciju postojećih (Parichy i sur. 2009), kako je i vidljivo iz uzoraka embrija različite starosti (Slika 15 A u usporedbi sa Slikom 15 B). Stanice s dlakom imaju strukturne funkcionalne i molekularne sličnosti sa stereocilijama u unutarnjem uhu

sisavaca, uključujući selektivnu osjetljivost na ototoksine (Ma i Raible 2009; Sonnack i sur. 2015). Bojanje neuromasta zebrice spojem ASP+ prikazano je i u radu autora Hernández i sur. 2006

Kako stanice s dlakom otkrivaju mehanički signal i pretvaraju ga u električni signal, bogate su mitohondrijima te je za njihovo pravilno djelovanje bitna homeostaza iona. Za njezino održavanje potrebna je djelatnost transportnih proteina i ionskih kanala. Otkriveno je da anionski transporter porodice Slc4, Slc4a2b, ima ulogu u razvoju neuromasta zebrice. Provodi transporte Cl^-/Cl^- i $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ održavajući uski raspon vrijednosti pH (Qian i sur. 2020). Kako su i ASP+ i rodamin 123 kationske boje, u neuromastima bi mogli postojati i kationski transporteri, a oboje su supstrati kationskog transportera Oct1. Do sada nije otkrivena njegova lokalizacija u neuromastima, međutim poznato je da je ljudski transporter OCT2, između ostalih mjesta, lokaliziran u pužnici sisavaca, u raznim tipovima potpornih stanica i ganglijima te stereocilijama (Ciarimboli i sur. 2010; Hellberg i sur. 2015). Uočena je i niža ekspresija transportera Oct1 kod miša (More i sur. 2010; Hellberg i sur. 2015). Transporter Oct1 zebrice sličan je ljudskim transporterima OCT1 i OCT2, po ekspresijskom profilu i transportnim svojstvima (Mihaljević i sur. 2017). Stoga, njegova lokalizaciju u neuromastima zebrice funkcionalno odgovara lokalizaciji transportera OCT2 u pužnici čovjeka.

Ionociti, specijalizirane stanice kože i škrga zebrica, odgovorne su za održavanje pH i ionske homeostaze tijekom ranog razvoja zebrica prije stvaranja škrga (14 dpf, Rombough 2002), a same postaju funkcionalne 24 hpf (Flynt i sur. 2009). Boja ASP+ akumulira se u ionocitima po cijelom tijelu zebrice (Slika 11), a LY u samo pojedinim stanicama (Slike 19 B i E). Signali se uočavaju kao točkice prisutne po cijelom tijelu embrija i ličinke, a manja veličina i veća brojnost razlikuje ih od neuromasta. Prema svojoj funkciji i ekspresiji transportera, ionociti zebrica analogni su stanicama različitih segmenata tubula bubrega sisavaca (Hwang i Chou 2013).

Pretpostavka istraživanja akumulacije fluorescentnih boja u zebricama bila je da, ukoliko se boja lokalizira u bubregu, moguće je da je ona supstrat membranskog transportera Oct1 jer je to mjesto njegove najveće ekspresije kod odraslih zebrica. Pretpostavka je potvrđena korištenjem boje ASP+, koja je supstrat transportera Oct1. Uz neuromaste, neuralnu cijev, žumanjčanu vreću, olfaktorni epitel i probavilo, snažan signal je uočen u pronefrosu, posebice anteriorno, na mjestu glomerula i proksimalnih tubula (Slike 11 D, G i H). Također je bio vidljiv i tok boje kroz tubul i izbacivanje iz organizma kroz kloaku (Slika 11 E). Stoga se u bubregu očekivala lokalizacija i

drugih supstrata transportera Oct1, berberina i rodamina 123. Međutim, kod Berb lokalizacija je uočena samo u žumanjčanoj vreći i probavilu, a kod Rh123 i u neuromastima i olfaktornom epitelu, a signala nije bilo u pronefrosu. Razlog tome nije uporaba preniske koncentracije boje za vidljivost signala jer su pojedine korištene koncentracije bile veće od K_m vrijednosti transportera za supstrate. Štoviše, ASP+ ima najveću K_m vrijednost (25.97 μM , Mihaljević 2015) od ostalih promatranih supstrata, a signal u pronefrosu je bio vidljiv i pri koncentracija 1 μM . S druge strane, K_m vrijednost Rh123 je 103.7 nM (Mihaljević 2015), a signal nije bio vidljiv pri koncentracijama 0.1 i 1 μM . Mogući razlog te razlike u lokalizaciji u pronefrosu ranih faza razvoja zebrice je promjena afiniteta transportera Oct1 za supstrate ovisno o razvojnoj fazi. Poznato je da su rast i diferencijacija stanica barem djelomično regulirani brzinom transporta metabolita i iona preko stanične membrane (Martonosi 1975). No, za testiranje ove hipoteze također bi trebalo ponoviti istraživanje.

Lokalizacija u pronefrosu uočena je i kod anionskih boja lucifer žuto i 2,7-diklorofluorescin, ali manjeg intenziteta. Signal LY nalazi se na mjestu distalnih tubula (Slike 19 B i E), a signal 2,7-dCIF na mjestu glomerula i dijela proksimalnih tubula (Slike 21 C i D). Neki od anionskih transportera u bubregu zebrice su Oat3, Oat2c, Oat2e, Oat10 (Popović 2014; Mihaljević i sur. 2017). Međutim, do sada je poznato da je LY supstrat anionskih transportera Oat1, Oat2a, Oat2d te Oatp1d1 (Popović i sur. 2013; Dragojević i sur. 2017), stoga nema preklapanja u poznatim podacima. Zanimljivo je se transporter OAT1 kod ljudi nalazi u bubregu (Nishimura i Naito 2005), a kod zebrice njegova ekspresija tamo nije detektirana (Mihaljević i sur. 2016). Od navedenih transportera bubrega, Oat3 ima najveću ekspresiju kod ranog razvoja zebrice, od 24 do 120 hpf (Slika 33). 6-CF je njegov supstrat (Dragojević 2018), ali njegova lokalizacija u bubregu nije uočena (Slika 25).

Uočeno je da je nakon nastanka funkcionalnog probavila (120 hpf) signal svake od boja najvećeg intenziteta upravo u crijevima. Umjesto želudca, zebrice imaju anteriorno crijevo koje je većeg lumena od posteriornog crijeva te srednjeg dijela između njih. U njemu nema žlijezdi za izlučivanje klorovodične kiseline pa stoga ni nema nisku vrijednost pH (Brugman 2016). Štoviše, probavni sustav zebrice nikad nema vrijednost pH ispod 7.5. (Nalbant i sur. 1999). Membranski transporteri za apsorpciju hranjivih tvari nalaze se u anteriornom crijevu i srednjem probavilu. Kao jedan od njih navodi se i Oct1 kao važan posrednik transporta kationa iz lumena crijeva do intersticija (McCreight i sur. 2016).

Nakon nekog vremena, posebice nakon dugih inkubacija (24 ili 48 hps), dolazi do izbacivanja boje iz zebriće u medij, što je vidljivo kao tok boje kroz kloaku i povećanje fluorescencije medija. Međutim, fluorescencija medija bila je jaka pri svim duljinama inkubacija embrija u boji 2,7-dCIF, što može biti posljedica njezine sposobnosti adhezije za plastiku. Boje ASP+ i LY iz organizma su se izbacivale preko tubula pronefrosa (Slika 11 E, Slika 19 E), a Berb i 6-CF kroz probavni sustav (Slika 13 C, Slika 25 D). Poznato je da dugotrajna inkubacija ličinki zebriće berberinom dovodi do raznih bolesti kardiovaskularnog sustava (Martini i sur. 2020). Stoga, izbacivanjem ksenobiotika iz stanica putem *efflux* transportera te njihovim transportom u smjeru lumena tubula bubrega ili crijeva sprječava se njihovo nakupljanje u organizmu i potencijalni toksični učinak.

Nakon praćenja akumulacije fluorescentnih boja na embrijima divljeg tipa, odabrana su dva supstrata transportera Oct1, ASP+ i Rh123, te su ti spojevi korišteni u daljnjim istraživanjima. ASP+ je izabran jer je uočena snažna lokalizacija u bubregu, mjestu najveće ekspresije transportera Oct1 kod odrasle zebriće, a Rh123 je izabran jer ima specifičan uzorak lokalizacije u neuromastima. Cilj *in vivo* praćenja akumulacije fluorescentnih supstrata transportera Oct1 na embrijima deficijentnim za Oct1 je bio uočiti promjenu mjesta lokalizacije boje, odnosno, nedostatak signala u pojedinim dijelovima tijela gdje se smatra da postoji transporter Oct1. To bi značilo da je upravo Oct1 bio transporter koji je unio boju u organ. A u slučaju da nije eksprimiran (KO Oct1 embriji) i da boja nije supstrat nekog drugog transportera u tom organu, neće biti signala. Taj rezultat dobiven je za supstrat ASP+. Tijekom inkubacije embrija divljeg tipa vrlo snažan signal je uočen u bubregu u svim promatranim stadijima sve dok se signal probavnog sustava nije preklopio s njime (Slika 11). Međutim, kod inkubacije KO Oct1 embrija, signala u bubregu nema (Slike 28 A-D). Iako su istraživanja na KO Oct1 embrijima bila ograničena brojem embrija i vremenom pa inkubacija zebrića u bojama nije napravljena na svim stadijima i vremenima inkubacije, iz ovog inicijalnog rezultata može se potvrditi pretpostavka da uslijed kratkotrajnih inkubacija (1 i 2 hps) embrija i ličinki zebrića starosti 3 i 5 dana nema lokalizacije signala u bubregu, što je vjerojatno posljedica odsustva membranskog transportera Oct1. S druge strane, nakon inkubacije Oct1 KO embrija s bojom Rh123 uzorak lokalizacije je bio isti kao i nakon inkubacije embrija divljeg tipa. Signali su se nalazili u neuromastima, olfaktornom epitelu,

žumanjčanoj vreći i probavilu. Stoga nije bilo vidljivog utjecaja nedostatka ekspresije transportera Oct1 na lokalizaciju Rh123, ukazujući da su vjerojatno drugi membranski transporteri odgovorni za transport tog spoja kroz membrane uočenih organa.

Isti uzorak fluorescentnih signala dobiven je inkubacijom embrija u mediju s bojom te mikroinjektiranjem boje u žumanjčanu vreću. Time se došlo do pretpostavke da je inicijalan unos boje iz medija bio posredovan endocitozom ili pinocitozom u žumanjčanu vreću, a ne kroz ostale dijelove kože zebrice, te da se boja krvotokom dalje proširila do određenih dijelova tijela sa specifičnim transporterima. Krvne žile koje su lokalizirane uz žumanjčanu vreću i sudjeluju u apsorpciji potrebnih hranjivih tvari su proširene kardinalne vene te, nakon njihovog formiranja 2.5 dpf, podcrijevne vene (Isogai i sur. 2001). Iako je žumanjčana vreća gusto ispunjena granulama hranjivih tvari, i ASP+ i LY su se difuzijom brzo proširili po cijelom području. Nakon toga, ASP+ je krvotokom došao do stanica bubrega i olfaktornog epitela (Slika 29), dok se LY zadržao u žumanjčanoj vreći (Slika 30). Također, postojanost signala u žumanjčanoj vreći i nakon pojave signala u drugim dijelovima tijela pokazuje da se boja veže za neke dijelove tvari u njemu, stoga žumanjčana vreća nije samo mjesto prolaska boje iz vanjskog okoliša do krvotoka zebrice.

4.3. Imunofluorescencijske metode za otkrivanje unutarstanične i tkivne lokalizacije proteina Oct1 u ličinkama zebrice

Imunohistokemijskom analizom krioprereza ličinki zebrica genotipa divljeg tipa i Oct1 KO s antitijelima za Oct1, vidljiva je razlika u lokalizaciji signala (Slika 32). Međutim, signal membrana hondrocita pektoralnih peraja i glave je bio nespecifičan jer je bio prisutan kod embrija divljeg tipa kao i Oct1 KO embrija. Pretpostavka je da je to posljedica poliklonalnosti korištenih antitijela, tj. da hondrociti sadrže protein sekvence slične epitopu. Monoklonalna antitijela korisna su u procjeni promjena u molekularnoj konformaciji proteina, protein-protein interakcija i strukturnih modifikacija te u identificiranju pojedinačnih članova proteinskih porodica. Međutim, ta stroga specifičnost monoklonalnih antitijela znači da neće prepoznati protein ukoliko su se dogodile male promjene u strukturi epitopa. S druge strane, poliklonalna antitijela su heterogena i mogu prepoznati epitop i uslijed malih strukturnih promjena. Međutim, zbog toga postoji vjerojatnost za nespecifična vezanja na epitope slične strukture (Lipman i sur. 2005). To je

prihvatljivo u ovom slučaju gdje uz istraživani uzorak postoji i kontrolni (KO za istraživani protein) prema kojem se može odrediti (ne)specifičnost antitijela.

Kod ljudi i glodavaca, transporter Oct1 je uglavnom eksprimiran na sinusoidnoj membrani jetre. Kod štakora također postoji veća razina ekspresije u koži, na bazolateralnim membranama proksimalnih tubula bubrega, na bazolateralnim membranama enterocita tankog i debelog crijeva te u slezeni (Gründemann i sur. 1994; Slitt i sur. 2000). Kod miševa uočena je veća ekspresija u bubregu nego u jetri, te manja razina ekspresije u tankom i debelom crijevu (Alnouti i sur. 2005; Morse i sur. 2019). Kod odraslih zebrića najveća ekspresija zabilježena je u bubregu, a manja ekspresija u jetri, a u crijevima, mozgu, skeletnim mišićima razina ekspresije je bila vrlo mala (Mihaljević i sur. 2016). Kod ljudi najveća ekspresija nalazi se u jetri (Gorboulev i sur. 1997; Zhang i sur. 1997), a u bubregu *in situ* hibridizacijom nije uočena ekspresija, dok je osjetljivijom metodom RT-PCR pokazana niska razine ekspresije, kao i u srcu, koštanim mišićima, neuronima i dišnom sustavu (Gorboulev i sur. 1997.). Iz toga je vidljiva razlika u tkivnoj ekspresiji ortologa transportera Oct1. Te tkivno specifične regulacije transkripcije u različitim vrstama proizlaze iz razlika u promotorskim sekvencama i proteinama uključenim u njihovu transkripciju i regulaciju ekspresije (Koepsell 2020). Također, osim vrsno-specifične tkivne ekspresije, razina ekspresije transportera Oct1 ovisi i o starosti organizma, tj. stadiju u kojem se nalazi. Pretpostavka je bila da se na presjecima Oct1 KO zebrića neće vidjeti signal u bubregu, kao mjestu ekspresije transportera Oct1, za razliku od presjeka zebrića divljeg tipa. Taj rezultat je i dobiven. Međutim, pretpostavka je proizašla iz tkivne ekspresije proteina Oct1 u odraslim zebrićima (Mihaljević i sur. 2016). Poznato je da su transporteri iz porodice SLC22 eksprimirani tijekom velikog dijela embrionalnog razvoja, ali da im se mjesta lokalizacije u embriju i odrasloj jedinki ponekad razlikuju (Pavlova 2000) kao i da postoje razlike u razini ekspresije, npr. kod štakora se razina ekspresije transportera Oct1 povećava 4.5 puta od rođenja do 45. dana (Slitts i sur. 2002). To je također prisutno i kod zebrića, a povećanje ekspresije transportera Oct1 tijekom prvih dana razvoja vidljivo je iz prethodno napravljenih ekspresijskih profila (Slika 33).

Stoga, imunohistokemijskom analizom i pomoću akumulacije fluorescentnih boja (barem u slučaju ASP+) dokazano da u Oct1 KO zebrićima ne dolazi do proizvodnje proteina Oct1. Međutim, moguće je da se kao posljedica toga u stanicama aktiviraju kompenzacijski mehanizmi,

tj. da dolazi do povećane ekspresije sličnih gena koji mogu, barem djelomično, preuzeti funkciju gena čija je translacija narušena (El-Brolosy i Stainier 2017). Stoga se, ukoliko se tijekom daljnjeg razvitka zebrice ne uoči nikakav fenotip koji bi odgovarao narušenom metabolizmu bubrega uslijed nedostatka funkcije transportera Oct1, trebaju provesti daljnja istraživanja koja će otkriti moguće povišene ekspresije drugih srodnih transportera uslijed djelovanja kompenzacijskih mehanizama.

Također, u daljnjim istraživanjima akumulacije boja u embrijima, potrebno je još detaljnije odrediti vremena inkubacije i koncentracije pojedinih boja. Kako bi odredili razliku između pasivnog unosa boja i transporta posredstvom transportera, bilo bi korisno napraviti inhibicijske transportne biotestove *in vitro* kojima se, uz pomoć unosa poznatog supstrata, prati unos određenog spoja u stanice te tako karakterizira interakcija spoja s transporterom.

5. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem dobiven je inicijalni uvid u djelovanje membranskog transportera Oct1 u embrijima i ličinkama zebrice. Nakon interpretacije rezultata dobivenih metodama *in vivo*, *in vitro* i *in silico* zaključeno je sljedeće:

1. Embriji i ličinke zebrice (0-5 dpf) deficitarne za transporter Oct1 fenotipski se ne razlikuju od zebrica divljeg tipa, kao ni zebrica koje su dostigle spolnu zrelost (3-4 mjeseca). Stoga zaključujem da transporter Oct1 nije ključan za vijabilnost i fertilnost zebrica promatrane starosti od 0 dpf do 4 mjeseca.
2. Svaka od fluorescentnih boja posjeduje specifične karakteristike u odnosu na mogućnosti prolaska kroz korion, ovisnosti intenziteta obojenja o dužini inkubacije i koncentraciji boje te izbacivanje iz organizma kroz pronefros ili probavni sustav
3. Fluorescentne boje iz vodenog okoliša ulaze u embrio zebrice kroz žumanjčanu vreću te ostaju u njoj i nakon akumulacije u drugim organima.
4. Male promjene u strukturi spoja utječu na njihova mjesta lokalizacije unutar embrija i ličinki zebrice.
5. Kationski spojevi ASP+, rodamin 123 i berberin, supstrati membranskog transportera Oct1, ne pokazuju isti obrazac akumulacije u embrijima i ličinkama zebrice.
6. Membranski transporter Oct1 potreban je za akumulaciju spoja ASP+ u bubregu embrija i ličinki zebrice starosti 3 i 5 dpf, što potvrđuje pretpostavku. Međutim, djelovanje transportera Oct1 nije ključno za unos boja ASP+ i Rh123 u neuromaste i olfaktorni epitel.
7. Kao što i pretpostavljeno prema ekspresiji u odraslim zebricama, membranski transporter Oct1 lokalizira se u bubregu ličinke zebrice starosti 4 dpf.
8. Razina ekspresije membranskog transportera Oct1 tijekom ranog razvoja zebrice (1-5 dpf) veća je od svih promatranih transportera porodice SLC22 te jedina pokazuje kontinuirani rast.

6. LITERATURA

- Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P., Richardson, M. K. (2011): Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 93(2): 115-133.
- Alnouti, Y., Petrick, J. S., Klaassen, C. D. (2006): Tissue distribution and ontogeny of organic cation transporters in mice. *Drug Metabolism and Disposition*. 34(3): 477-482.
- Anon. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union* L276, 20.10.2010, 33–79.
- Arbeloa, I. L., Ojeda, P. R. (1981): Molecular forms of rhodamine B. *Chemical Physics Letters*. 79(2): 347-350.
- Bartlett, J. M., Stirling, D. (2003): A short history of the polymerase chain reaction. In *PCR protocols*. Humana Press. 3-6.
- Beija, M., Afonso, C. A., Martinho, J. M. (2009): Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chemical Society Reviews*. 38(8): 2410-2433.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2001): *Biochemistry*, Chapter 35, Drug development.
- Brast, S., Grabner, A., Sucic, S., Sitte, H. H., Hermann, E., Pavenstädt, H., ... Ciarimboli, G. (2012): The cysteines of the extracellular loop are crucial for trafficking of human organic cation transporter 2 to the plasma membrane and are involved in oligomerization. *The FASEB Journal*. 26(3): 976-986.
- Bresler, V. M., Bresler, S. E., Nikiforov, A. A. (1975): Structure and active transport in the plasma membrane of the tubules of frog kidney. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 406(4): 526-537.
- Brugman, S. (2016): The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. *Developmental & Comparative Immunology*. 64: 82-92.
- Byrd Baronio, D., Chen, Y. C., Decker, A. R., Enckell, L., Fernández-López, B., Semenova, S., ... Panula, P. (2021): Vesicular monoamine transporter 2 (SLC18A2) regulates monoamine turnover and brain development in zebrafish. *Acta Physiologica*. e13725.

- Byrd, C. A., Brunjes, P. C. (1995): Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *Journal of Comparative Neurology*, 358(2), 247-259.
- Caldwell, J., Gardner, I., Swales, N. (1995): An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicologic pathology*. 23(2): 102-114.
- Cardoso-Gustavson, P., Aguiar, J. M. R. B. V., Pansarin, E. R., de Barros, F. (2013): A light in the shadow: the use of Lucifer Yellow technique to demonstrate nectar reabsorption. *Plant methods*. 9(1): 1-7.
- Carpio, Y., Estrada, M. P. (2006): Zebrafish as a genetic model organism. *Biotechnología Aplicada*. 23(4): 265-270.
- Carvalho, L., Heisenberg, C. P. (2010): The yolk syncytial layer in early zebrafish development. *Trends in cell biology*. 20(10): 586-592.
- Chen, L., Pawlikowski, B., Schlessinger, A., More, S. S., Stryke, D., Johns, S. J., ... Giacomini, K. M. (2010): Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin. *Pharmacogenetics and genomics*. 20(11): 687.
- Chen, Y., Hu, X., Sun, J., Zhou, Q. (2016): Specific nanotoxicity of graphene oxide during zebrafish embryogenesis. *Nanotoxicology*. 10(1): 42-52.
- Cheung, K. Y., Jesuthasan, S. J., Baxendale, S., Van Hateren, N. J., Marzo, M., Hill, C. J., Whitfield, T. T. (2021): Olfactory rod cells: a rare cell type in the larval zebrafish olfactory epithelium with a large actin-rich apical projection. *Frontiers in Physiology*, 12.
- Ciarimboli, G., Schlatter, E. (2005): Regulation of organic cation transport. *Pflügers Archiv*. 449(5): 423-441.
- Ciarimboli, G., Deuster, D., Knief, A., Sperling, M., Holtkamp, M., Edemir, B., ... Schlatter, E. (2010): Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *The American journal of pathology*. 176(3): 1169-1180.

- Ciarimboli, G., Schlatter, E. (2016): Organic cation transport measurements using fluorescence techniques. In Neurotransmitter Transporters (pp. 173-187). Humana Press, New York, NY.
- Converse, A., Thomas, P. (2020). The zinc transporter ZIP9 (Slc39a9) regulates zinc dynamics essential to egg activation in zebrafish. *Scientific reports*. 10(1): 1-14.
- Dahm, R., Geisler, R. (2006): Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine biotechnology*. 8(4): 329-345.
- D'Amico, F., Skarmoutsou, E., Stivala, F. (2009). State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of immunological methods*. 341(1-2): 1-18.
- Dragojević, J. (2018): Karakterizacija prijenosnika organskih aniona zebrice (*Danio rerio* Hamilton, 1822). Doktorski rad.
- Dragojević, J., Mihaljević, I., Popović, M., Zaja, R., Smital, T. (2018): In vitro characterization of zebrafish (*Danio rerio*) organic anion transporters Oat2a-e. *Toxicology in Vitro*. 46: 246-256.
- Druml, B., Cichna-Markl, M. (2014): High resolution melting (HRM) analysis of DNA—Its role and potential in food analysis. *Food chemistry*. 158. 245-254.
- Drummond, I. A., Davidson, A. J. (2016): Zebrafish kidney development. *Methods in cell biology*. 134: 391-429.
- Drummond, I. A., Majumdar, A., Hentschel, H., Elger, M., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., ...Fishman, M. C. (1998): Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development*. 125(23): 4655-4667.
- Du, S. J., Frenkel, V., Kindschi, G., Zohar, Y. (2001): Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein. *Developmental biology*. 238(2): 239-246.
- Ekins, S., Nikolsky, Y. Nikolskaya, T. (2005): Techniques: application of systems biology to absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity. *Trends in pharmacological sciences*. 26(4): 202-209.

- El-Brolosy, M. A., Stainier, D. Y. (2017): Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS genetics*. 13(7): e1006780.
- Elsalini, O. A., Rohr, K. B. (2003): Phenylthiourea disrupts thyroid function in developing zebrafish. *Development genes and evolution*. 212(12): 593-598.
- Ferguson, J. L., Shive, H. R. (2019): Sequential Immunofluorescence and Immunohistochemistry on Cryosectioned Zebrafish Embryos. *Journal of visualized experiments: JoVE*. (147).
- Field, H. A., Ober, E. A., Roeser, T., Stainier, D. Y. (2003): Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Developmental biology*. 253(2): 279-290.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., Zeller, R. (2008): Cryosectioning tissues. *CSH Protoc*. 2008(8).
- Flores, E. M., Nguyen, A. T., Odem, M. A., Eisenhoffer, G. T., Krachler, A. M. (2020): The zebrafish as a model for gastrointestinal tract–microbe interactions. *Cellular microbiology*. 22(3): e13152.
- Flynt, A. S., Thatcher, E. J., Burkewitz, K., Li, N., Liu, Y., Patton, J. G. (2009): miR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos. *Journal of Cell Biology*. 185(1): 115-127.
- Franklin, M. R. (2014): Xenobiotic Absorption, Distribution, Metabolism, and excretion. *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*, 29.
- Gerlach, G. F., Wingert, R. A. (2013): Kidney organogenesis in the zebrafish: insights into vertebrate nephrogenesis and regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2(5): 559-585.
- Goessling, W., Sadler, K. C. (2015): Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology*. 149(6): 1361-1377.
- Gorboulev, V., Ulzheimer, J. C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., ... Koepsell, H. (1997): Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA and cell biology*. 16(7): 871-881.

- Gründemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Veyhl, M., Koepsell, H. (1994): Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature*. 372(6506): 549-552.
- Gutzman, J. H., Sive, H. (2009): Zebrafish brain ventricle injection. *Journal of visualized experiments: JoVE*. (26).
- Hansen, A., Zeiske, E. (1993). Development of the olfactory organ in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Comparative Neurology*, 333(2), 289-300.
- Harris, J. A., Cheng, A. G., Cunningham, L. L., MacDonald, G., Raible, D. W., Rubel, E. W. (2003): Neomycin-induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 4(2): 219-234.
- Hellberg, V., Gahm, C., Liu, W., Ehrsson, H., Rask-Andersen, H., Laurell, G. (2015): Immunohistochemical localization of OCT2 in the cochlea of various species. *The Laryngoscope*. 125(9): E320-E325.
- Hermanson, G. T. (2013): *Bioconjugate techniques*. Academic press.
- Hernández, P. P., Moreno, V., Olivari, F. A., Allende, M. L. (2006): Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hearing research*. 213(1-2): 1-10.
- Houart, C. (2001): *Zebrafish as an Experimental Organism*. e LS.
- Hwang, P. P., Chou, M. Y. (2013): Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 465(9): 1233-1247.
- Inazu, M., Takeda, H., Matsumiya, T. (2003): Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *Journal of neurochemistry*. 84(1): 43-52.
- Isogai, S., Horiguchi, M., & Weinstein, B. M. (2001): The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Developmental biology*. 230(2): 278-301.

- Jaźwińska, A., Sallin, P. (2016). Regeneration versus scarring in vertebrate appendages and heart. *The Journal of pathology*. 238(2): 233-246.
- Johnson. (2012): A systematic review of secondary antibodies cited in literature. *Materials and Methods*. 132(2).
- Jonker, J. W., Wagenaar, E., Mol, C. A., Buitelaar, M., Koepsell, H., Smit, J. W., Schinkel, A. H. (2001): Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a
- Jonker, J. W. Schinkel, A. H. (2004): Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 308(1): 2-9.
- Jonker, J. W., Wagenaar, E., Mol, C. A., Buitelaar, M., Koepsell, H., Smit, J. W., Schinkel, A. H. (2001): Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [Slc22a1]) gene. *Molecular and Cellular Biology*. 21(16): 5471-5477.
- Jouan, E., Le Vee, M., Denizot, C., Da Violante, G., Fardel, O. (2014): The mitochondrial fluorescent dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCT s) 1 and 2. *Fundamental & clinical pharmacology*. 28(1): 65-77.
- Kais, B., Schneider, K. E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T. (2013): DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic toxicology*. 140: 229-238.
- Kaler, G., Truong, D. M., Sweeney, D. E., Logan, D. W., Nagle, M., Wu, W., ... Nigam, S. K. (2006): Olfactory mucosa-expressed organic anion transporter, Oat6, manifests high affinity interactions with odorant organic anions. *Biochemical and biophysical research communications*. 351(4): 872-876.
- Karlsson, J., von Hofsten, J., Olsson, P. E. (2001): Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Marine biotechnology*. 3(6): 522-527.

- Kim, D. H., Hwang, C. N., Sun, Y., Lee, S. H., Kim, B., Nelson, B. J. (2006): Mechanical analysis of chorion softening in prehatching stages of zebrafish embryos. *IEEE transactions on nanobioscience*. 5(2): 89-94.
- Kimmel, C. B., Law, R. D. (1985): Cell lineage of zebrafish blastomeres: III. Clonal analyses of the blastula and gastrula stages. *Developmental biology*. 108(1): 94-101.
- Kimmel, C. B., Law, R. D. (1985a): Cell lineage of zebrafish blastomeres: I. Cleavage pattern and cytoplasmic bridges between cells. *Developmental biology*. 108(1): 78-85.
- Kimmel, C. B., Law, R. D. (1985b): Cell lineage of zebrafish blastomeres: II. Formation of the yolk syncytial layer. *Developmental biology*. 108(1): 86-93.
- Kirla, K. T., Groh, K. J., Poetzsch, M., Banote, R. K., Stadnicka-Michalak, J., Eggen, R. I., ... Kraemer, T. (2018): Importance of toxicokinetics to assess the utility of zebrafish larvae as model for psychoactive drug screening using meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) as example. *Frontiers in pharmacology*. 9: 414.
- Koepsell, H., Lips, K., Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharmaceutical research*. 24(7): 1227-1251.
- Koepsell, H. (2015): Role of organic cation transporters in drug–drug interaction. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 11(10): 1619-1633.
- Koepsell, H. (2020): Organic cation transporters in health and disease. *Pharmacological reviews*. 72(1): 253-319.
- Koetsier, G., Cantor, E. (2019): A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. New England Biolabs Inc.
- Kudoh, T., Tsang, M., Hukriede, N. A., Chen, X., Dedekian, M., Clarke, C. J., ... Dawid, I. B. (2001): A gene expression screen in zebrafish embryogenesis. *Genome research*. 11(12): 1979-1987.

- Kuncova, J., Kallio, P. (2004): Challenges in capillary pressure microinjection. In The 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (Vol. 2, pp. 4998-5001). IEEE.
- Lee, K. J., Nallathamby, P. D., Browning, L. M., Osgood, C. J., Xu, X. H. N. (2007): In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS nano*. 1(2): 133-143.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012): Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. (62): e3923.
- Li, Z., Ptak, D., Zhang, L., Walls, E. K., Zhong, W., Leung, Y. F. (2012): Phenylthiourea specifically reduces zebrafish eye size. *PloS one*. 7(6): e40132.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., Weis-Garcia, F. (2005): Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*. 46(3): 258-268.
- Lips, K. S., Volk, C., Schmitt, B. M., Pfeil, U., Arndt, P., Miska, D., ... Koepsell, H. (2005): Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 33(1): 79-88.
- Liu, X., Pan, G. (Eds.). (2019): Drug transporters in drug disposition, effects and toxicity. Springer.
- Lu, X., Long, Y., Li, X., Zhang, L., Li, Q., Wen, H., ... Cui, Z. (2021): Generation of Knockout and Transgenic Zebrafish to Characterize Abcc4 Functions in Detoxification and Efflux of Lead. *International journal of molecular sciences*. 22(4): 2054.
- Ma, E. Y., Raible, D. W. (2009): Signaling pathways regulating zebrafish lateral line development. *Current Biology*. 19(9): R381-R386
- Macdonald, R. (1999). Zebrafish immunohistochemistry. *Molecular Methods in Developmental Biology*. 77-88.
- Martini, D., Pucci, C., Gabellini, C., Pellegrino, M., Andreazzoli, M. (2020): Exposure to the natural alkaloid Berberine affects cardiovascular system morphogenesis and functionality during zebrafish development. *Scientific reports*. 10(1) 1-16.

- Martonosi, A. (1975): Membrane transport during development in animals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 415(3): 311-333.
- McCreight, L. J., Bailey, C. J., Pearson, E. R. (2016): Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*. 59(3): 426-435.
- Mihaljević, I. (2015): Characterization of organic cation transporters in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822). Doktorski rad.
- Mihaljević, I., Popovic, M., Zaja, R., Smital, T. (2016). Phylogenetic, syntenic, and tissue expression analysis of slc22 genes in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC genomics*. 17(1): 1-13.
- Mihaljević, I., Popović, M., Žaja, R., Maraković, N., Šinko, G., Smital, T. (2017): Interaction between the zebrafish (*Danio rerio*) organic cation transporter 1 (Oct1) and endo-and xenobiotics. *Aquatic Toxicology*. 187: 18-28.
- Miyares, R. L., de Rezende, V. B., Farber, S. A. (2014): Zebrafish yolk lipid processing: a tractable tool for the study of vertebrate lipid transport and metabolism. *Disease models & mechanisms*. 7(7): 915-927.
- Monte, J. C., Nagle, M. A., Eraly, S. A., Nigam, S. K. (2004): Identification of a novel murine organic anion transporter family member, OAT6, expressed in olfactory mucosa. *Biochemical and biophysical research communications*. 323(2): 429-436.
- More, S. S., Akil, O., Ianculescu, A. G., Geier, E. G., Lustig, L. R., Giacomini, K. M. (2010): Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *Journal of Neuroscience*. 30(28): 9500-9509.
- Morse, B. L., Kolar, A., Hudson, L. R., Hogan, A. T., Chen, L. H., Brackman, R. M., ... Hillgren, K. M. (2020): Pharmacokinetics of organic cation transporter 1 (OCT1) substrates in OCT1/2 knockout mice and species difference in hepatic OCT1-mediated uptake. *Drug Metabolism and Disposition*. 48(2): 93-105.
- Nalbant, P., Boehmer, C., Dehmelt, L., Wehner, F., Werner, A. (1999): Functional characterization of a Na⁺-phosphate cotransporter (NaPi-II) from zebrafish and identification of related transcripts. *The Journal of physiology*. 520(1): 79-89.

- Nies, A. T., Koepsell, H., Damme, K., Schwab, M. (2011): Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Drug transporters*. 105-167.
- Nishimura, M., Naito, S. (2005): Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 20(6): 452-477.
- Ober, E. A., Field, H. A., Stainier, D. Y. (2003): From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mechanisms of development*, 120(1), 5-18.
- Outtandy, P., Russell, C., Kleta, R., Bockenhauer, D. (2019): Zebrafish as a model for kidney function and disease. *Pediatric Nephrology*. 34(5), 751-762.
- P Domingo, M., Pardo, J., Cebolla, V., M Galvez, E. (2010): Berberine: a fluorescent alkaloid with a variety of applications from medicine to chemistry. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 7(4): 335-340.
- Panja, S., Aich, P., Jana, B., Basu, T. (2008): How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*?. *Molecular membrane biology*. 25(5): 411-422.
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., Engeszer, R. E. (2009): Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental dynamics*. 238(12): 2975-3015.
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., Engeszer, R. E. (2009): Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental dynamics*: 238(12): 2975-3015.
- Pavlova, A., Sakurai, H., Leclercq, B., Beier, D. R., Yu, A. S., Nigam, S. K. (2000): Developmentally regulated expression of organic ion transporters NKT (OAT1), OCT1, NLT (OAT2), and Roct. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 278(4): F635-F643.
- Pintelon, I., De Proost, I., Brouns, I., Van Herck, H., Van Genechten, J., Van Meir, F., ... Adriaensen, D. (2005): Selective visualisation of neuroepithelial bodies in vibratome slices

- of living lung by 4-Di-2-ASP in various animal species. *Cell and tissue research*. 321(1): 21-33.
- Poon, K. L., Brand, T. (2013): The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny fish with mighty prospects. *Global Cardiology Science and Practice*. 2013(1): 4.
- Popović, M., Zaja, R., Fent, K., & Smital, T. (2013). Molecular characterization of zebrafish Oatp1d1 (Slco1d1), a novel organic anion-transporting polypeptide. *Journal of Biological Chemistry*. 288(47): 33894-33911.
- Popović, M. (2014): Identifikacija, karakterizacija i ekotoksikološka važnost membranskih transportnih proteina obitelji SLC21 i SLC22 zebrice (*Danio rerio* Hamilton, 1822). Doktorski rad.
- Qian, F., Wang, X., Yin, Z., Xie, G., Yuan, H., Liu, D., Chai, R. (2020): The slc4a2b gene is required for hair cell development in zebrafish. *Aging (Albany NY)*. 12(19): 18804.
- Rawson, D. M., Zhang, T., Kalicharan, D., Jongebloed, W. L. (2000): Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture Research*. 31(3): 325-336.
- Reddy, V. S., Shlykov, M. A., Castillo, R., Sun, E. I., Saier Jr, M. H. (2012): The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *The FEBS journal*. 279(11): 2022-2035.
- Rombough, P. (2002): Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O₂ uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Experimental Biology*. 205(12): 1787-1794.
- Rosen, J. N., Sweeney, M. F., Mably, J. D. (2009): Microinjection of zebrafish embryos to analyze gene function. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. (25): e1115.
- Roth, M., Obaidat, A., Hagenbuch, B. (2012): OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British journal of pharmacology*. 165(5): 1260-1287.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239(4839): 487-491.
- Sainova, I., Bichkidjieva, E., Savov, Y., Ilieva, I., Gluhcheva, Y., Zvetkova, E. (2006): Evaluation of Berberine as a DNA-Specific Fluorescent Dye and DNA-Intercalating Antitumor Alkaloid. *Acta morphologica et anthropologica* 11(1): 139.
- Sant Halbach, K., Ulrich, N., Goss, K. U., Seiwert, B., Wagner, S., Scholz, S., ...Reemtsma, T. (2020): Yolk sac of zebrafish embryos as backpack for chemicals?. *Environmental Science & Technology*. 54(16): 10159-10169.
- Sant, K. E., Timme-Laragy, A. R. (2018): Zebrafish as a model for toxicological perturbation of yolk and nutrition in the early embryo. *Current environmental health reports*. 5(1): 125-133.
- Slitt, A. L., Cherrington, N. J., Hartley, D. P., Leazer, T. M., Klaassen, C. D. (2002): Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metabolism and Disposition*. 30(2): 212-219.
- Smith, S. J., Horstick, E. J., Davidson, A. E., Dowling, J. (2015): Analysis of zebrafish larvae skeletal muscle integrity with evans blue dye. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (105).
- Sonnack, L., Kampe, S., Muth-Köhne, E., Erdinger, L., Henny, N., Hollert, H., ... Fenske, M. (2015): Effects of metal exposure on motor neuron development, neuromasts and the escape response of zebrafish embryos. *Neurotoxicology and teratology*. 50: 33-42.
- Stainier, D. Y., Lee, R. K., Fishman, M. C. (1993): Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development*. 119(1): 31-40.
- Tao, T., Peng, J. (2009). Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Genetics and Genomics*. 36(6): 325-334.
- Ugwu, M. C., Pelis, R., Esimone, C. O., Agu, R. U. (2017): Fluorescent organic cations for human OCT2 transporters screening: uptake in CHO cells stably expressing hOCT2. *ADMET and DMPK*. 5(2): 135-145.

- Van Gils, M., Willaert, A., De Vilder, E. Y. G., Coucke, P. J., Vanakker, O. M. (2018): Generation and Validation of a Complete Knockout Model of *abcc6a* in Zebrafish. *Journal of Investigative Dermatology*. 138(11): 2333-2342.
- Váradi, A., Sarkadi, B. (2003): Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*. 17(1-4): 103-114.
- Vliegenthart, A. B., Tucker, C. S., Del Pozo, J., Dear, J. W. (2014): Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *British journal of clinical pharmacology*. 78(6): 1217-1227.
- Voytas, D. (2000): Resolution and recovery of large DNA fragments. *Current protocols in molecular biology*. 51.
- Wang, D. S., Jonker, J. W., Kato, Y., Kusuhara, H., Schinkel, A. H., Sugiyama, Y. (2002): Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 302(2): 510-515.
- Wei Ge, (2018): *Encyclopedia of Reproduction*. U: Skinner, M.K.. Zebrafish. Cambridge, Academic Press, str. 704-710,
- Westerfield, M. (2000): *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- White, R. J., Collins, J. E., Sealy, I. M., Wali, N., Dooley, C. M., Digby, Z., ... Busch-Nentwich, E. M. (2017): A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *Elife*. 6: e30860.
- White, R. M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., ... Zon, L. I. (2008): Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell stem cell*. 2(2): 183-189.
- Williams, J. A., Holder, N. (2000): Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hearing research*. 143(1-2): 171-181.

- Xin, Y., Duan, C. (2018): Microinjection of antisense morpholinos, CRISPR/Cas9 RNP, and RNA/DNA into zebrafish embryos. In *Hypoxia* (pp. 205-211). Humana Press, New York, NY.
- Xu, C., Zon, L. I. (2010): The zebrafish as a model for human disease. In *Fish Physiology* (Vol. 29, pp. 345-365). Academic Press
- Zhang, L., Dresser, M. J., Gray, A. T., Yost, S. C., Terashita, S., Giacomini, K. M. (1997): Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Molecular pharmacology*. 51(6): 913-921.
- Zhu, C., Nigam, K. B., Date, R. C., Bush, K. T., Springer, S. A., Saier Jr, M. H., ... Nigam, S. K. (2015): Evolutionary analysis and classification of OATs, OCTs, OCTNs, and other SLC22 transporters: structure-function implications and analysis of sequence motifs. *PloS one*. 10(11): e0140569.

Internetski izvori:

URL1: www.ebi.ac.uk/gxa (pristupljeno 26.8.2021.)

URL2: www.ensembl.org (pristupljeno 22.7.2021.)

URL3: www.nebiolabs.com.au (pristupljeno 22.7.2021.)

URL4: www.snapgene.com (pristupljeno 22.7.2021.)

URL5: www.tmcaculator.neb.com (pristupljeno 22.7.2021.)

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Marina Horvat

Datum rođenja: 15. listopada 1997.

Prebivalište: Hrastovac

OBRAZOVANJE:

<u>mag.biol.mol.</u> Biološki odsjek Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu	listopad 2019. – rujan 2021.
<u>univ.bacc.biol.mol.</u> Biološki odsjek Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu	rujan 2016. – rujan 2019.
<u>Maturant Opće gimnazije</u> Srednja škola “August Šenoa”, Garešnica	rujan 2012. – lipanj 2016.

POSTIGNUĆA:

<u>Predstavljanje postera</u> o osvojenoj Rektorovoj nagradi na 6. Simpoziju studenata bioloških usmjerenja	svibanj 2021.
<u>Rektorova nagrada</u> Kategorija: Nagrada za timski znanstveni i umjetnički rad (tri do deset autora) Tema rada: Mogućnost primjene natrijeva klorida, saharoze i salicilne kiseline za poboljšanje fitokemijskog sastava i antioksidacijskog kapaciteta klica rotkvice (<i>Raphanus sativus</i> L.) te njihove sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze	2019./2020.
<u>STEM stipendija</u> Ministarstva znanosti i obrazovanja	2018./2019.
<u>STEM stipendija</u> Ministarstva znanosti i obrazovanja	2017./2018.