

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Arvena Bošnjak

**Imunokemijska karakterizacija protutijela za
membranski protein Na⁺/K⁺-ATPazu u tkivima ribe
zebrice (*Danio rerio*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2022. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za molekularnu toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod voditeljstvom dr.sc. Deana Karaice i suvoditeljstvom izvr.prof.dr.sc. Duje Lisičićem i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar znanosti o okolišu.

Najiskrenije bih se željela zahvaliti mentoru dr.sc. Deanu Karaici na pruženoj prilici, strpljivosti, prenesenom znanju te velikoj pomoći pri izradi i pisanju diplomskog rada.

Puno hvala Jedinici za molekulsku toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada i Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković na mogućnosti izrade ovog rada, velikoj pomoći i uvijek ugodnoj atmosferi.

Zahvaljujem se dr.sc. Jeleni Dragojević Višević i dr. sc. Jovici Lončaru na učenju i velikoj pomoći prilikom provedbe mnogih Western blotova.

Posebno hvala Lani Vujici na pomoći u snalaženju u labosu i na divnom druženju tijekom izrade rada.

Zahvaljujem se svojem dečku Domagoju, koji je uvijek bio tu za mene tijekom studiranja i izrade diplomskog rada pružajući mi neizmjernu podršku i vjerujući u mene. Hvala ti što si pročitao ovaj cijeli, ne baš kratki, rad.

Od srca se zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi sve omogućili i bili velika podrška tijekom studiranja, a posebno tijekom izrade i pisanja diplomskog rada i bez kojih ništa ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Imunokemijska karakterizacija protutijela za membranski protein Na⁺/K⁺-ATPazu u tkivima ribe zebrice (*Danio rerio*)

Arvena Bošnjak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Riba zebrica, *Danio rerio* (Hamilton, 1822), modelni je organizam koji se danas sve više koristi u ekotoksikološkim i biomedicinskim istraživanjima. Kao i drugi kralježnjaci, ribe svoju osmotsku homeostazu organizma održavaju radi normalnog funkcioniranja fizioloških procesa. Natrij-kalij ATP-aza fiziološki je važan integralni membranski protein čija lokalizacija i razvojno-uvjetovana ekspresija u tkivima zebrice još uvijek nije u potpunosti istražena. Imunohistokemija je česta metoda istraživanja lokalizacije proteina u tkivima/stanicama sisavaca, kod koje postupak/odabir fiksacije može doprinijeti maskiranju epitopa te onemogućiti protutijelima uspješno vezanje za svoje specifično mjesto. No, korištenje optimalnih metoda otkrivanja epitopa može značajno poboljšati vezanje korištenog protutijela. Stoga je cilj ovog istraživanja bio, upotrebom različitih metoda otkrivanja epitopa, utvrditi optimalne uvjete za korištenje a6F protutijela u imunofluorescencijskoj analizi kriopreparata ribe zebrice. Koristeći utvrđene optimalne uvjete cilj je bio istražiti postojanje novih lokalizacija i postojanje razvojno-uvjetovane ekspresije proteina Na⁺/K⁺-ATP-aze tijekom prvih 120 h embrionalnog razvoja ribe zebrice. Istraživanje je pokazalo da je obrada kriopreparata deterdžentom SDS (engl. *sodium dodecyl sulphate*) uz razrjeđenje 1:400 protutijela a6F optimalan uvjet za određivanje lokalizacije proteina Na⁺/K⁺-ATP-aze u ribi zebrici. Konačno, otkriveno je da je lokalizacija α1 podjedinice natrij-kalij ATP-aze tkivno specifična te je da je njezina ekspresija razvojno- i zonski-uvjetovana.

(64 stranice, 23 slika, 132 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, PMF – Biološki odsjek, Marulićev trg 20, Zagreb

Ključne riječi: kriopreparati, imunofluorescencijska analiza, natrij-kalij ATP-aza, zebrica

Voditelj: dr. sc. Dean Karaica, znanstveni suradnik

Suvoditelj: izvr. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Ocjenitelji: izvr. prof. dr. sc. Duje Lisičić

doc. dr. sc. Sandra Hudina

prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović

doc. dr. sc. Ivan Čanjevca

Rad prihvaćen: 25.4.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Immunochemical characterization of the antibody for membrane protein Na⁺/K⁺-ATPase in Zebrafish (*Danio rerio*) tissues

Arvena Bošnjak

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) is a model organism that is increasingly being used today in ecotoxicology and biomedical studies. Fish, like other vertebrates, maintain their osmotic homeostasis to keep processes in their organism in the physiological range. Currently, localization and stage-dependent expression of Na⁺/K⁺-ATPase, an important membrane protein, in zebrafish tissue is not fully investigated. Immunohistochemistry is a method which is commonly used for investigating protein localization in mammalian tissues/cells. Choosing the right fixative/fixation procedure is an important step in this method because it can lead to epitope masking that prevents antibodies from successful binding. The usage of optimal antigen retrieval method can significantly improve antibody binding. Thus, the aim of this study was to find optimal antigen retrieval method for determining the localization of Na⁺/K⁺-ATPase in zebrafish cryosections. Furthermore, using these optimal conditions the study aimed to investigate the existence of new localization sites and stage-related expression of Na⁺/K⁺-ATPase in zebrafish embryos. The study showed that the optimal antigen retrieval method is treatment of cryosections with sodium dodecyl sulfate (SDS) using 1:400 a6F antibody dilution. Finally, it showed that the localization of the Na⁺/K⁺-ATPase α 1 subunit is tissue specific with stage- and zone-dependent expression.

(64 pages, 23 figures, 132 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library, Faculty of Science – Department of Biology,
Marulićev trg 20, Zagreb

Key words: cryosections, immunofluorescence analysis, sodium-potassium ATPase, zebrafish

Supervisor: dr.sc. Dean Karaica, research associate

Cosupervisor: Assoc. Prof. Duje Lisičić, PhD

Reviewers: Assoc. Prof. Duje Lisičić, PhD

Asst. Prof. Sandra Hudina, PhD

Prof. Blanka Cvetko Tešović, PhD

Asst. Prof. Ivan Čanjevac, PhD

Thesis accepted: 30.6.2022.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Karakteristike ribe zebrice, <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)	1
1.2. Zebrica kao modelni organizam u istraživanjima	2
1.2.1. Biomedicinska i ekotoksikološka istraživanja	2
1.2.2. Istraživanja razvojnih procesa	4
2. Embrionalni i ličinački razvoj ribe zebrice	4
2.1. Stadij zigote	4
2.2. Stadij dioba	5
2.3. Stadij blastule	5
2.4. Stadij gastrule	6
2.5. Stadij segmentacije	7
2.6. Stadij faringule	8
2.7. Stadij izlijeganja	8
2.8. Stadij ličinke	9
3. Organogeneza, anatomija i histologija bubrega, probavnog sustava i unutarnjeg uha ribe zebrice	9
3.1. Bubrež	9
3.2. Probavni sustav	12
3.3. Unutarnje uho	14
4. Osmoregulacijski mehanizmi ribe zebrice	15
5. Istraživanja lokalizacije i ekspresije proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u ribi zebrici	15
5.1. Struktura i lokalizacija proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze	15
5.2. Lokalizacija i ekspresija α 1 podjedinice proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u tkivima ribe zebrice	17

6. Metode lokalizacije proteina.....	19
6.1. Imunohistokemijske metode.....	19
6.1.1. Metode fiksiranja i otkrivanja epitopa	20
6.2. Fluorescentna mikroskopija.....	20
7. CILJ ISTRAŽIVANJA	23
8. MATERIJAL I METODE	24
8.1. Materijal.....	24
8.1.1. Pokusne životinje	24
8.1.2. Pufferi, otopine i kemikalije	24
8.1.2.1. Fiksacija i rezanje embrija zebrića kriomikrotomom	24
8.1.2.2. Imunofluorescencijska i histokemijska analiza	26
8.1.2.3. Cjelokupni preparati (eng. <i>whole-mount</i>).....	28
8.1.2.4. Western blot.....	29
8.1.2.5. Peptidi i protutijela za imunofluorescencijske i histokemijske analize	31
8.1.3. Laboratorijska oprema i potrošni materijal	31
8.1.4. Računalni programi	33
8.2. Metode	33
8.2.1. Uzgoj i uzorkovanje pokusnih životinja.....	33
8.2.2. Fiksacija i izrada kriopreparata embrija ribe zebriće	34
8.2.3. Imunofluorescencijska analiza	35
8.2.4. Razvojno-uvjetovana ekspresija proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u bubregu (pronefrosu) ribe zebriće.....	37
8.2.5. Histološko bojanje.....	38
8.2.7. Western blot	38
8.2.8. Prikupljanje i obrada mikroskopskih slika	40
9. REZULTATI.....	42
9.1. Optimizacija uvjeta za lokalizaciju $\alpha 1$ podjedinice proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze	42
9.2. Lokalizacija $\alpha 1$ podjedinice membranskog proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u tkivima ribe zebriće	43
9.3. Promjena ekspresije $\alpha 1$ podjedinice proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze.....	46
9.3.1. Razvojno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze.....	46

9.3.2. Zonalno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze.....	47
9.4. Kompatibilnost imunofluorescentnog protokola i protokola za histološko bojanje.....	51
9.5. Western blot.....	52
10. RASPRAVA.....	57
11.Literatura	61
12. Životopis.....	66

1. UVOD

1.1. Karakteristike ribe zebrice, *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Zebrica, *Danio rerio* (Hamilton, 1822), slatkovodna je tropska riba koja živi u rijeci Ganges, u područjima Himalaje te u područjima južne Azije. Pripada nadrazredu koštunjače (Osteichthyes), razredu zrakoperki (Actinopterygii), redu šaranki (Cypriniformes) te porodici šarana (Cyprinidae) (Carpio i Estrada 2006). Ženka i mužjak mogu se lako morfološki razlikovati po povećanom trбуhu ženke i njezinom nedostatku crvenog odsjaja duž srebrnih pruga na tijelu (Slika 1) (Braunbeck i Lammer 2006). Male su veličine, svega 3-4 cm duljine, a njihovo je održavanje jeftino i jednostavno. Veliki fekunditet i prozirnost embrija i ličinki njihove su velike prednosti kao modelnih organizama. Imaju vanjsku oplodnju pri čemu mogu imati po nekoliko stotina oplođenih jaja. Embriji i ličinke prozirni su do 7 dana nakon oplodnje što olakšava istraživanja razvoja organizma i ekotoksikološka istraživanja (Roper i Tanguay 2018). Također, relativno je jednostavno napraviti transgene linije zebrice koji ne sintetiziraju melanin stoga su prozirni tijekom cijelog ličinačkog stadija (Link i Megason 2008). Genom zebrice sadrži 71 % ljudskih gena od kojih su 82 % geni povezani s bolestima kod ljudi što predstavlja veliki značaj u kliničkim i biomedicinskim istraživanjima. Zbog razvojne sličnosti i genetske homologije postoje također i morfološke i fiziološke sličnosti u određenim organima između sisavaca i zebrice (Roper i Tanguay 2018). Zebrica se kao modelni organizam počeo koristiti još 1980ih te predstavlja vrlo vrijedan model za istraživanja upravo zbog molekularnih i genomskih sličnosti s ostalim kralježnjacima. Stoga su mnoga otkrića u njihovom razvoju primjenjiva i na ljude (Veldman i Lin 2008).



Slika 1. Slika prikazuje dvije ribe zebrice, *Danio rerio*. Gornja jedinka je ženka, a od mužjaka se razlikuje po povećanom trбуhu i nedostatku crvenog odsjaja duž srebrnih pruga na tijelu (Braunbeck i Lammer 2006).

1.2. Zebrica kao modelni organizam u istraživanjima

1.2.1. Biomedicinska i ekotoksikološka istraživanja

Zebrice su zbog svog sekvenciranog genoma, jednostavne genetske manipulacije, vanjske oplodnje, brzog razvoja i prozirnosti embrija izvrstan i sve više korišteni modelni organizam u medicini, istraživanjima bioloških procesa i ljudskih bolesti. Stvoreno je više od 10 000 mutanata zebrica i nekoliko transgenih linija za istraživanja bolesti ljudi što je omogućilo proučavanje raka, poremećaja živčanog sustava, kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, bolesti

bubrega, dijabetesa, sljepoće i gluhoće, bolesti probavnog sustava, hematopoetske bolesti i mišićne poremećaje (Teame i sur. 2019). Mnogi fenotipovi mutanata slični su fenotipovima ljudskih bolesti što nam daje uvid u patofiziologiju tih bolesti (Dooley i Zon 2000). Izbacivanjem (eng. *knock out*) ili insercijom (eng. *knock in*) specifičnih gena, dobiveni su mutanti zebrića koji služe kao biomedicinski modeli za istraživanje različitih bolesti. Na primjer, ako pacijent ima bolest povezanu s metabolizmom, rade se različite mutacije u genima zebriće povezanim s metabolizmom te se prate promjene u genskoj ekspresiji različitim molekularnim metodama. Također, zebriće predstavljaju pogodan model za praćenje novih terapija i lijekova (Teame i sur. 2019). S obzirom da je identificiran jako velik broj fenotipski različitih mutanata i njihov nam je genom jako dobro poznat, moguće je odrediti funkcije gena i njihovu važnost u signalnim putevima tijekom razvoja i bolesti metodom *forward* genetike (Dooley i Zon 2000). Također, pogodan su model za *in vivo* istraživanja i mjerenja apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije spojeva iz okoliša koji su potencijalno opasni za ljudsko, ali i zdravlje ostalih živih bića (Bambino i Chu 2017).

Osim u biomedicinskim istraživanjima, zebrića je glavni modelni organizam u (eko)toksikološkim istraživanjima mehanizama toksičnosti i toksikodinamike (Hill i sur. 2005). Danas je u okolišu sve više toksičnih spojeva kojima su ljudi svakodnevno izloženi stoga se zebrića koristi kao model za ispitivanje letalnih doza i fenotipskih promjena organizma koje oni uzrokuju (Bambino i Chu 2017). Poznati su njihovi morfološki, biokemijski i fiziološki parametri tijekom svih faza razvoja, od embrija do odraslih jedinki, te je prema postojećim standardima moguće identificirati promjene uzrokovane različitim toksičnim spojevima. Te se promjene mogu vrlo lako pratiti upravo zbog njihove prozirnosti koja je također vrlo dobra karakteristika za *in situ* hibridizaciju i imunohistokemijske metode. Danas postoje brojni histološki markeri koji omogućuju istraživanje abnormalnih morfoloških promjena ili aktivaciju određenih signalnih puteva uzrokovanih toksinima u specifičnim tkivima. Na primjer, imunohistokemijskim je metodama otkriveno mjesto aktivacije CYP1A gena u epitelnim stanicama kardiovaskularnog sustava pod utjecajem halogeniranih aromatskih ugljikovodika i poliaromatskih ugljikovodika. Također, upravo zbog prozirnosti moguće je vidjeti obojenje u tkivima cjelokupnih (eng. *whole-mount*) preparata koji su pokazali kolokalizaciju različitih receptora arilnih ugljikovodika u

zebričinom kardiovaskularnom sustavu (Hill i sur. 2005). Transgene linije koje sadrže fluorescentni protein ili neku drugu mjerljivu komponentu koriste se u biomonitoringu radi detektiranja prisutnosti različitih toksina u okolišu. Kod takvih jedinki dolazi do ekspresije gena za luciferazu ili zelenog fluorescentnog proteina (eng. *green fluorescent protein*; GFP) kao odgovor na prisutnost zagađivača kao što su aromatski ugljikovodici, različiti metali, hormoni ili retinoidi. Osim detektiranja prisutnosti toksina, pomoću transgenih linija moguće je istraživati i molekularne mehanizme te patologiju povezanu s okolišnim izlaganjem (Bambino i Chu 2017).

1.2.2. Istraživanja razvojnih procesa

Zebrice su zbog svoje transparentnosti izvrstan razvojni model (Dawid 2004). Različite razvojne faze zebrice koriste se za istraživanja učinaka različitih spojeva kojima su ljudi izloženi već od početka života te s obzirom da imaju strukturno sličnu krvno-moždanu barijeru kao ostali kralježnjaci, koriste se u istraživanjima utjecaja neurotoksina na razvoj živčanog sustava (Roper i Tanguay 2018). Tijekom prvih 8 h njihovog razvoja moguće je pratiti brazdanje embrionskih stanica, epiboliju, uspostavljanje anteriorno-posteriorne osi i organogenezu pod mikroskopom (Dawid 2004). Istraživanja ekspresije i funkcije gena korištenjem transgenih linija te modifikacije genoma daju uvid u razvojne procese (Roper i Tanguay 2018). Još jedna prednost zebrica u istraživanjima razvojne biologije jest njihov brz rast i razvoj. Blastula ulazi u fazu gastrulacije već oko 5 h nakon oplodnje. Somitogeneza počinje 10 h nakon oplodnje, a do 24 h već je vidljiv donekle razvijen živčani sustav i organi su u početnim fazama razvoja. Embriji izlaze iz koriona oko 60 h nakon oplodnje, a do 72 h većina je organa skoro do kraja razvijena, te jedinke plivaju i odgovaraju na podražaje (Link i Megason 2008). Česta su istraživanja razvoja probavnog i enteričkog živčanog sustava zebrice zbog sličnosti sa sisavcima te ih njihov manje kompleksan razvoj i struktura organa čini pogodnim pokusnim modelom (Carpio i Estrada 2006).

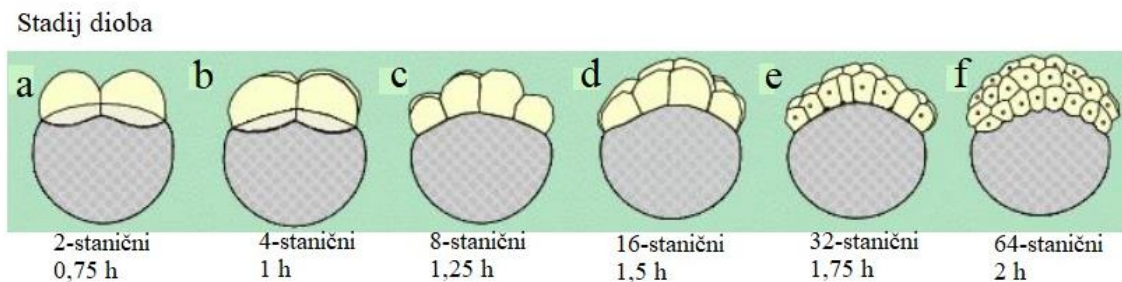
2. Embrionalni i ličinački razvoj ribe zebrice

2.1. Stadij zigote

Period zigote traje oko 40 minuta nakon fertilizacije, sve do pojave prvog brazdanja, odnosno diobe. Tijekom ove početne jednostanične faze, korion bubri i odiže se od oplodjenog jaja. Tada su vidljiva kretanja citoplazme pri kojem dio bez žumanjka odlazi na animalni pol, razdvajajući blastodisk od vegetativnog pola bogatog žumanjkom (Kimmel i sur. 1995).

2.2. Stadij dioba

Nakon prve diobe stanica, svaka se sljedeća dioba događa u intervalima od 15 minuta (Slika 2). Citoplazmatske diobe su meroblastične, blastodisk se neravnomjerno dijeli, a blastomere ostaju povezane citoplazmatskim mostom. Diobe brazde vertikalno su orijentirane sve do 32-staničnog stadija. Tijekom dvostanične faze, brazda se izdiže u blizini animalnog pola te progresira prema vegetativnom polu, prolazeći samo kroz blastodisk, ali ne i kroz žumanjčanu regiju. Pri dnu blastodiska, brazda postaje horizontalno orijentirana te cijepa blastodisk. Dvije nastale blastomere jednakih su veličina. U 16-staničnom ciklusu neke stanice, po prvi put, postaju potpuno odvojene jedne od drugih. Također, 12 vanjskih stanica povezane su sa žumanjkom citoplazmatskim mostom, a četiri centralne su nepovezane. U 64-staničnom stadiju, ujedno i zadnjem stadiju diobe, po prvi puta neke blastomere u potpunosti prekrivaju druge (Kimmel i sur. 1995).

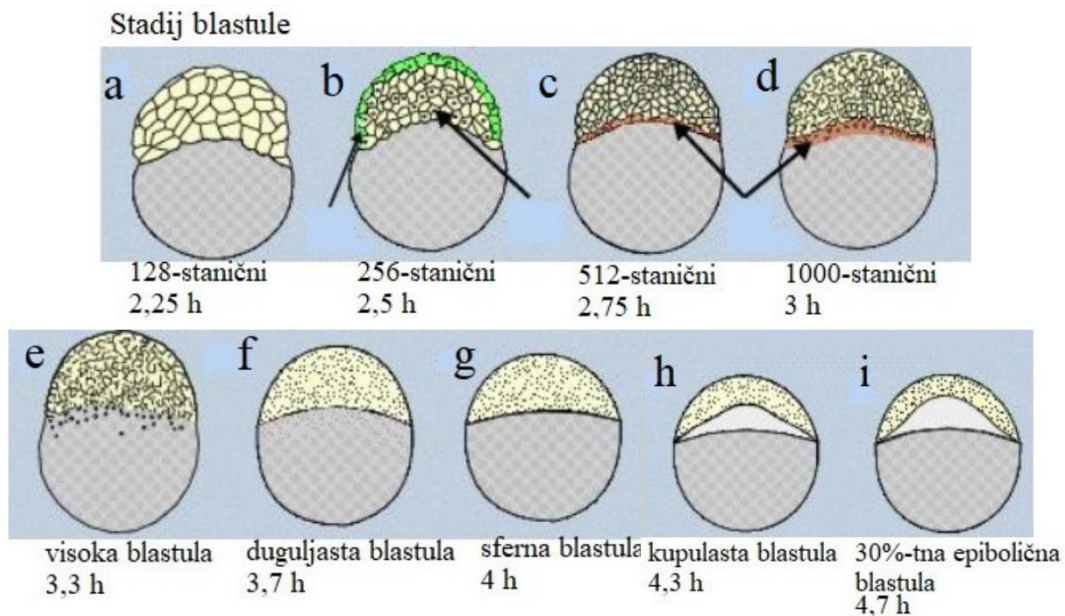


Slika 2. Slike a-f redom predstavljaju stadij brazdanja zebrice: 2-stanični, 4-stanični, 8-stanični, 16-stanični, 32-stanični i 64-stanični ciklus (Preuzeto i prilagođeno prema Webb i Miller 2007).

2.3. Stadij blastule

Stadij blastule obuhvaća period od 128-staničnog stadija do gastrulacije. U ovom stadiju blastula prolazi kroz fazu prijelazne srednje blastule, formira se sincicijalni sloj oko žumanjka i započinje

epibolija, odnosno zatvaranje unutrašnjih slojeva stanica pomoću vanjskih slojeva, koja traje i tijekom gastrulacije. Sincicijalni sloj jedinstven je za prave koštunjače koji prvo stvara prsten oko rubova blastodiska, a zatim se širi ispod njega tvoreći unutarnji sincicij koji opstaje kroz embriogenezu. Razlikujemo nekoliko stadija blastule: 128-stanični, 256-stanični, 512-stanični i 1000-stanični stadij te visoku, duguljastu, kupulastu, sfernu i 30 %-tnu epiboličnu blastulu (Slika 3). Blastula opisana postotkom definira koliki je postotak žumanjčanih stanica prekriven blastodermom. Epibolija stvara blastoderm pretežno jednake debljine (Kimmel i sur. 1995).

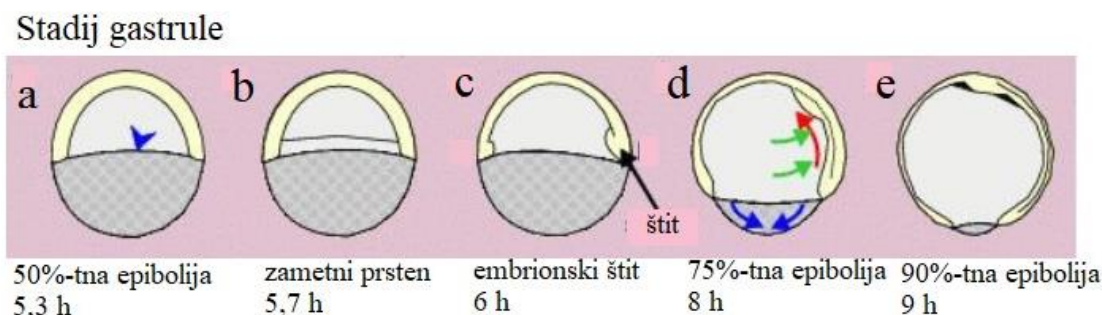


Slika 3. Slike a-i redom predstavljaju stadije blastule: 128-stanični, 256-stanični, 512-stanični i 1000-stanični stadij te visoku, duguljastu, kupulastu, sfernu i 30 %-tna epiboličnu blastulu (Preuzeto i prilagođeno prema Webb i Miller 2007).

2.4. Stadij gastrule

Tijekom stadija gastrule, proces epibolije se nastavlja, nastaje zametni sloj i osovina embrija (Slika 4) (Kimmel i sur. 1995). Duboke stanice blastoderma kreću se prema van interkalirajući s površinskim stanicama te u potpunosti prekrivaju žumanjčane stanice. Nakon što stanice blastoderma prekriju polovicu žumanjčanih stanica, dolazi do stanjivanja blastoderma na njegovim rubovima. To stanjivanje naziva se zametni prsten koji se sastoji od površinskog sloja epiblasta i

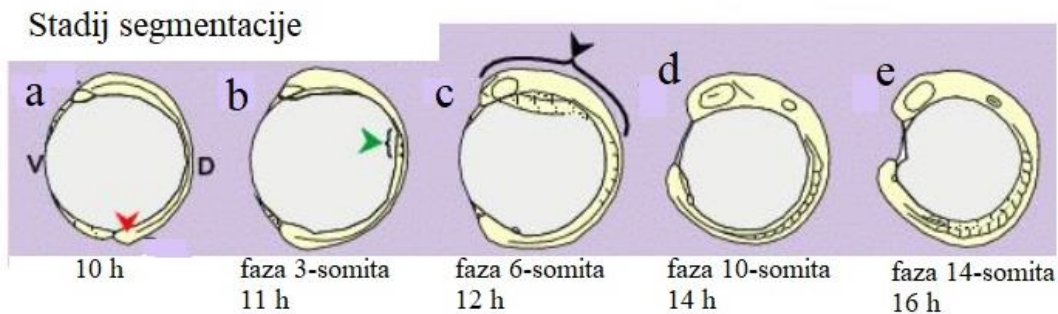
unutarnjeg sloja hipoblasta. Stanice epiblasta i hipoblasta interkaliraju na budućoj dorzalnoj strani embrija i tvore lokalizirano zadebljanje, odnosno embrionski štit. Stanice hipoblasta embrionalnog štita šire se anteriorno tvoreći prekursor notokorda, kordamezoderm, a prekursor mezodermalnih somita čine paraksijalne mezodermalne stanice. Nadalje, dio stanica epiblasta formiraju prekordalnu ploču, a preostale stanice tvore kožu ribe (Gilbert i sur. 2007).



Slika 4. Slike a-e prikazuju stadij gastrule (Preuzeto i prilagođeno iz Webb i Miller 2007).

2.5. Stadij segmentacije

Segmentacijski stadij obuhvaća razvojne stadije između 10-24 h nakon oplodnje, tijekom kojih dolazi do razvoja somita pri čemu se prvo razvijaju anteriorni, a zatim posteriorni, vide se začeci organa i rep postaje sve duži (Slika 5). Dolazi do prvih diferencijacija stanica i prvih pokreta tijela. Nakon formiranja somita, na njihovoj se površini formira epitel. Unutarnje stanice somita razvit će se u miomere ili segmente mišića. Drugi derivat somita je sklerotom iz kojeg kasnije nastaje vezivno tkivo kralježnice. Pronefros se razvija duboko iz trećeg para somita. Također, tijekom ovog stadija dolazi do razvoja notokorda, endoderma i epiblasta, koji je sada isključivo ektodermalni. Neuralna cijev nastaje sekundarnom neurulacijom iz neuralne ploče, odnosno iz prekordalne ploče (Kimmel i sur. 1995)



Slika 5. Slike a-e prikazuju stadij segmentacije tijekom kojeg dolazi do razvoja miomera, sklerotoma, pronefrosa, notokorda, endoderma, epiblasta i neuralne cijevi (Preuzeto i prilagođeno prema Webb i Miller 2007).

2.6. Stadij faringule

Stadij faringule započinje 3. dana nakon oplodnje, a odnosi se na stadij kada možemo uspoređivati različite morfološke značajke embrija s drugim kralježnjacima. Tada je embrio bilateralne organizacije s dobro razvijenim notokordom, ubrzanim razvojem metencephalona i mozgom podijeljenim na pet režnjeva. Ovaj stadij obilježava razvoj ždrijelnih lukova, izravnavanje glave i kontinuirani rast u duljinu. Razvijaju se peraje te se pojavljuje pigmentacija retinalnih epitelnih stanica i melanofori počinju formirati karakteristični obrazac longitudinalnih linija duž tijela. Formira se cirkulacijski sustav, u srcu nastaju komore i krv počinje cirkulirati. Također, pojavljuje se osjetljivost na taktilni podražaj te sinkronizacija miotoma prilikom plivanja (Kimmel i sur. 1995).

2.7. Stadij izlijeganja

Stadij izlijeganja događa se u periodu 48-72 h nakon oplodnje. Zebrice se nazivaju embrijima do 3. dana nakon oplodnje, a nakon što izađu iz koriona nazivaju se ličinkama. Većina organa je do ovog stadija već razvijena, izuzev probavnog sustava i još nekih organa. Razvija se čeljusna hrskavica, a nakon nje škržni lukovi (Kimmel i sur. 1995).

2.8. Stadij ličinke

Stadij ličinke započinje izlaženjem embrija iz koriona, uglavnom nakon 3. dana od oplodnje i traje do 30. dana kada jedinke postaju juvenilne. Nakon 3. dana dolazi do punjenja plivaćeg mjehura zrakom i anteriorno-dorzalnog pružanja usta. Probavni sustav se pomiče više ventralno što ga čini uočljivijim, a žumanjčana vreća je skoro prazna. Mlada ličinka aktivno pliva, može pomicati čeljust, oči i peraje što joj omogućuje hranjenje, lovljenje plijena i bježanje (Kimmel i sur. 1995).

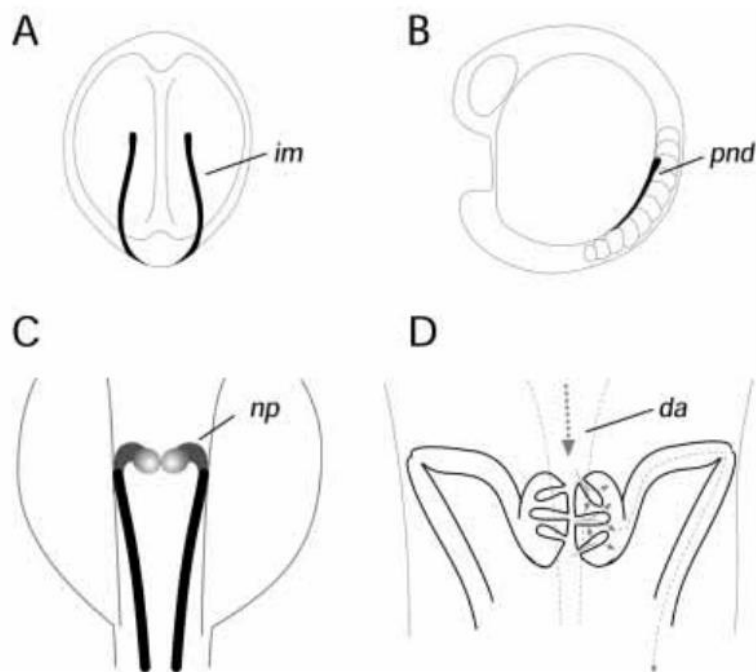
3. Organogeneza, anatomija i histologija bubrega, probavnog sustava i unutarnjeg uha ribe zebrice

3.1. Bubrež

Kralježnjaci tijekom svog razvoja prolaze kroz tri razvojna tipa bubrega: pronefros, mezonefros i metanefros (Drummond i sur. 1998; Drummond i Davidson 2016; Gerlach i Wingert 2013). Svaki od njih razvija se iz srednjeg mezoderma i sastavljen je od nefrona koji su osnovna građevna jedinica bubrega. Bubrezi kralježnjaka izbacuju otpadne tvari, provode osmoregulaciju, reapsorbiraju metabolite, održavaju acido-baznu ravnotežu i luče hormone. Nefroni na svom proksimalnom kraju filtriraju krvnu plazmu te odvođe filtrat u bubrežne kanaliće. U proksimalnim, srednjim i distalnim kanalićima taj se filtrat reapsorbira i/ili izlučuje, a dio tvari se skuplja u sabirni kanalić. Intersticijalne stanice izlučuju hormone te reguliraju dinamiku toka izvanstaničnog matriksa (Gerlach i Wingert 2013).

Pronefros embrija zebrice vrlo je jednostavno građen, od samo dva nefrona, stoga predstavlja dobar model za proučavanje nefrogeneze. U juvenilnoj fazi zebrica razvija mezonefros, koji se sastoji od nekoliko stotina nefrona, a zadržava ga i u odrasloj dobi te ne razvija metanefros. Bez obzira na to što zebrica ne razvija metanefros, postoje brojne sličnosti s bubrezima drugih kralježnjaka. Prekursor nefrona kod zebrice izražava gene ortologne drugim kralježnjacima te dijele brojne zajedničke stanične i molekularne karakteristike (Gerlach i Wingert 2013). Primordijum pronefrosa, kod zebrice se pojavljuje tijekom rane somitogeneze kao nakupina stanica srednjeg mezoderma ispod drugog i trećeg para somita. Od tog se položaja formiraju kanalići

pronefrosa sa svake strane embrija te se spajaju na posteriornom dijelu i izlaze iz embrija kroz analni otvor (Slika 6) (Kimmel i sur. 1995).

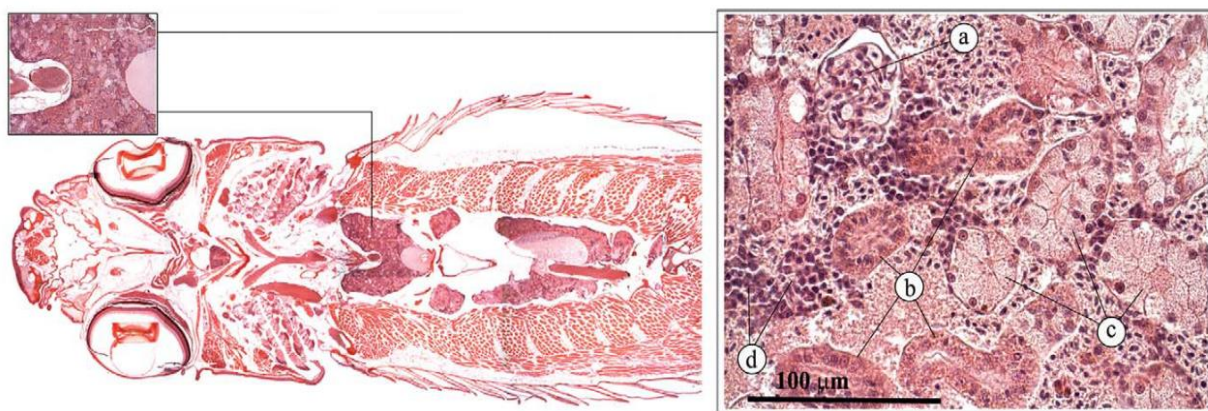


Slika 6. Prikaz stadija razvoja pronefrosa zebrice. U ranim fazama ravoja pronefrosa, 10-13 h nakon oplodnje, definirane su posteriorne regije srednjeg mezoderma (im) (A), nakon somatogeneze, dalje rastu kanalići pronefrosa (pnd) do 24 h nakon oplodnje kada su u potpunosti formirani (B). Iz prekursora nefrona (np) procesom morfogeneze nastaju glomerul i kanalići između 24-42 h nakon oplodnje (C). Između 42-48 h nakon oplodnje dolazi do vaskularizacije pronefrosa od dorzalne aorte (da) (D) (Drummond i sur. 1998).

U potpunosti formirani pronefros zebrice sastoji se od dva nefrona s glomerulom spojenima na sredini embrija ventralno od dorzalne aorte. Epitel kanalića podijeljen je na podjedinice od dva proksimalna kanalića (zavijeni proksimalni kanalić i ravni proksimalni kanalić) i dva distalna segmenta (rani i kasni distalni kanalići) koji su homologni segmentima nefrona sisavaca (Slika 7).

Zavijeni proksimalni kanalić strukturno je sličan proksimalnim kanalićima bubrega sisavaca zbog prisustnosti četkaste membrane (eng. *brush border membrane*) i visokih stupastih epitelnih stanica. Također, izražava gene za receptore megalin i kubilin te za kloridne/bikarbonatne anionske izmjenjivače *slc4a2* i natrij/bikarbonatne kotransportere *slc4a4a* koji doprinose održavanju acidobazne ravnoteže, a što je ujedno i uloga proksimalnih kanalića sisavaca. Uloga ravnog proksimalnog kanalića zebrića nije u potpunosti jasna, ali istraživanja su pokazala da ovaj kanalić izražava gene za sulfatne (*slc13a3*) i kalcijeve (*trpm7*) transportere što moguće ukazuje da je ovaj segment specijaliziran za unos određenih iona. Rani distalni segment izražava *slc12a1* gene za Na-K-Cl simporter, koji se kod sisavaca izražava jedino u uzlaznom dijelu distalnog kanalića. Aktivnost Slc12a1 ovisi o vraćanju K^+ iona natrag u kanaliće preko apikalnog natrijevog kanala Romk2 i o izbacivanju Cl^- iona preko kloridnog kanala Clkb. Kasni distalni segment izražava *slc12a3*, koji kodira za NaCl kotransporter te ABC transporter (*tmem161b*) kod zebrića stadija 24 h nakon oplodnje (Gerlach i Wingert 2013).

Bubreg odraslih zebrića nalazi se retroperitonealno i ventralno od kralježnice. Sastoji se od sličnih struktura kao i bubreg sisavaca od nefrona sa glomerulom, proksimalnim i distalnim kanalićima i sabirnom cijevi. U intersticiju bubrega nalaze se hematopoetske stanice. Endokrine stanice nalaze se duž glavnih krvnih žila u anterinom dijelu bubrega (Menke i sur. 2011).



Slika 7. Histološki prikaz bubrega: glomerula (a), proksimalnih i distalnih kanalića (b), sabirne cijevi (c) i hematopoetskog tkiva (d) (Menke i sur. 2011).

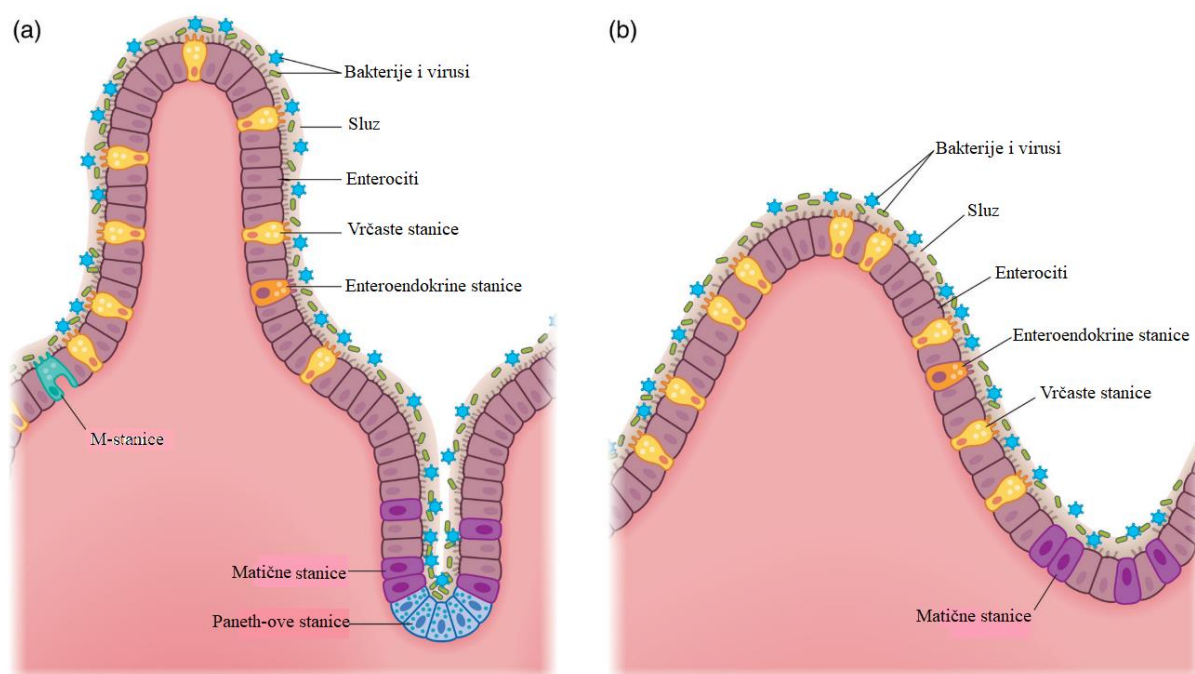
3.2. Probavni sustav

Probavna cijev viših kralježnjaka građena je od tankog i debelog crijeva. Uloga tankog crijeva je apsorpcija nutrijenata, a debelo crijevo apsorbira vodu i soli. Također, imaju važnu ulogu u obrani od patogena i okolišnih toksina. Kod zebrica razlikujemo dvije faze razvoja probavnog sustava koji započinje sredinom faze somita. Prvu fazu karakterizira ubrzano proširivanje probavnog primordijuma te sazrijevanje polariziranog epitelnog fenotipa. U ovoj je fazi u crijevu sve više glatkih mišića i prekursora enteričkog živčanog sustava. Druga faza karakterizirana je diferencijacijom epitela, glatkih mišića i enteričkog živčanog sustava uz morfogenezu složenog epitela (Wallace i sur. 2005).

Tijekom embrionalnog razvoja, progenitorske stanice endoderma probavnog sustava ulaze u hipoblast uz rubove blastoderma te posljedično migriraju u sredinu embrija. Endoderm crijeva završava svoju migraciju u fazi 18 somita, dok kod sisavaca migracija završava već na kraju gastrulacije. Zbog toga dolazi do kasnijeg formiranja crijeva zebrice, u kasnijoj fazi somita, nego kod sisavaca (Kimmel i sur. 1995). Prvo se formira crijevo, zatim ždrijelo i jednjak koji se izdižu iz endoderma anteriorno u odnosu na crijevo. Crijevo je sastavljeno od polariziranih epitelnih stanica koje eksprimiraju alkalnu fosfatazu, β -aktin i bazolateralni adherin, ali nedostaju probavni enzimi i apikalni spajajući kompleksi. U razdoblju od 34 h do 120 h nakon oplodnje dolazi do značajnog povećanja crijeva i epitelnih stanica (Wallace i sur. 2005).

Histološke i imunohistokemijske analize pokazale su da je građa enteričkog živčanog sustava i anatomija vezivnog tkiva i glatkih mišića usporediva sa građom tih sustava kod sisavaca, ali postoje neke razlike. Prvo, tanki sloj vezivnog tkiva (*lamina propria*) kod zebrica jednostavnije je građe nego kod sisavaca. Kod njih ne postoji sloj glatkih mišića (*muscularis mucosa*) koji bi bio usporediv sa takvim slojem kod sisavaca, već je *lamina propria* okružena cirkularnim i longitudinalnim mišićnim slojevima. Također, kod zebrica kao i kod ostalih koštunjača, crijevni je epitel organiziran nasumično, bez određenog reda, ne sadrži Lieberkuhnove kripte niti mijenterične ganglije već su identificirani samo individualni mijenterični neuroni. Odrasle zebrice nemaju

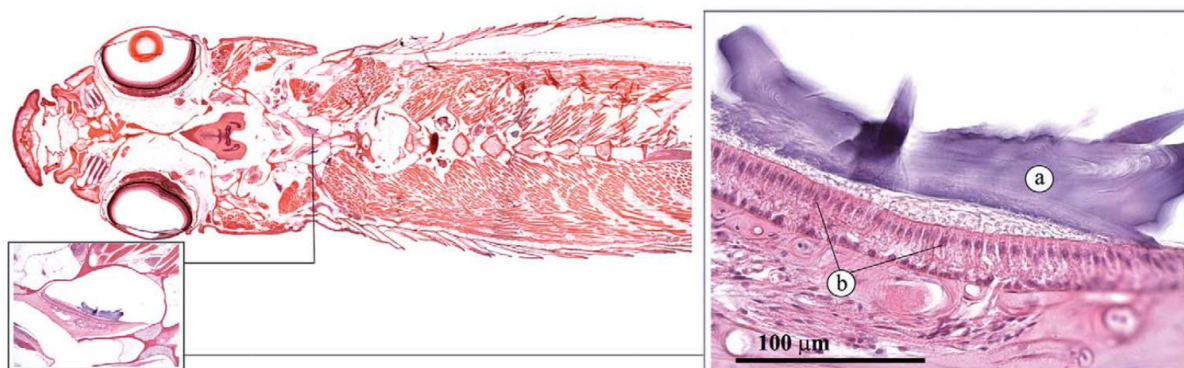
želudac, a crijevo im zauzima prostor skoro cijele trbušne šupljine. Anteriorni dio crijeva širi je od lumena posteriornog dijela stoga ima funkciju rezervoara te se u njemu nalaze probavni enzimi čija je primarna uloga apsorpcija nutrijenata. Srednji dio crijeva pomaže u apsorpciji nutrijenata ekspresijom transportera i probavnih enzima unutar enterocita. Većina nabora nema specifičnu organizaciju, uglavnom su nasumični. Završni dio srednjeg dijela crijeva analogan je ileumu sisavaca te sadrži specijalizirane enterocite koji sudjeluju u mukoznom imunitetu. Odmah nakon ovog dijela nalazi se posteriorni dio crijeva koji je kratak te ne sadrži apsorpcijske enterocite stoga je vjerojatno analogan debelom crijevu sisavaca. Visina tih nabora manja je u srednjem dijelu crijeva nego u anteriornom, a najkraći nabori koji su longitudinalno orijentirani definiraju posteriorni dio crijeva (Wallace i sur. 2005). Crijevni epitel sadrži različite stanice od kojih je najviše enterocita, a zatim vrčastih stanica (Slika 8) (Menke i sur. 2011).



Slika 8. Usporedba staničnih tipova i strukture probavnog sustava između sisavaca (a) i zebrice (b). Nabori crijeva zebrice nasumični su, ne sadrže kripte, Paneth-ove stanice i M-stanice. Zajedničke su im matične stanice, enterociti, enteroendokrine stanice i vrčaste stanice (Flores i sur. 2020).

3.3. Unutarnje uho

Unutarnje uho zebreice počinje se razvijati sredinom faze somita iz ušnog plakoda odnosno iz ektodermalnog zadebljanja u stražnjem dijelu mozga. Iz ušnog plakoda nastaje ušni vezikul iz kojeg se kasnije razvijaju sve ostale membranske strukture. Tijekom embrionalnog i ličinačkog stadija razvijaju se dvije maculae i tri cristae koje se sastoje od senzoričkih dlačnih stanica i pomoćnih stanica. Prvo se razvijaju dvije maculae koje su prekrivene otolitima, kristalnim naslagama kalcijevog karbonata i proteina (Slika 9), a kasnije će uho odrasle zebreice sadržavati 3 otolita, po jedno u svakoj od maculae (utriculus, sacculus i lagena). Iz tri cristae razvit će se tijekom ličinačke faze 3 polukružna kanalića. Prvo funkcionalno uho pojavljuje se kod 3 dana starih zebrića kada ličinka počinje koordinirano plivati i održavati ravnotežu. Iako je uho funkcionalno već od trećeg dana, ono se i dalje razvija sve do odrasle faze. Za poboljšanje sluha, zebrići služi Weberov aparat koji se sastoji od četiri kosti: tripus, intercalarium, scapium i claustrum koji povezuju unutarnje uho s plivaćim mjehurom te provode vibracije do uha (Whitfield i sur. 2002). Također, otoliti olakšavaju prijenos vibracija do dlačnih stanica maculae, a za formiranje otolita potrebna je $\alpha 1$ podjedinica Na^+/K^+ -ATPaze (Blasiolo i sur. 2006). Otoliti su veoma važni za percepciju zvuka, akceleracije i promjena u ravnoteži (Menke i sur. 2011).



Slika 9. Histološki prikaz otolita (a) i osjetnih epitelnih stanica (b) (Menke i sur. 2011).

4. Osmoregulacijski mehanizmi ribe zebrice

Kopneni i vodeni kralježnjaci uspješno su razvili mehanizme regulacije ionske i osmotske homeostaze. Kod kopnenih kralježnjaka tu funkciju obavljaju bubrezi, a kod vodenih škrge. Zebrice žive u hipotoničnim vodama s niskim ionskim koncentracijama gdje je pH promjenjiv stoga moraju aktivno apsorbirati ione iz okoliša i izbacivati amonijak kako bi uspješno održavali svoju homeostazu. Tijekom embrionalnog razvoja, prije nego što škrge postanu u potpunosti funkcionalne, u koži embrija razvijaju se ionociti koji su funkcionalni 24 h nakon oplodnje. Ionociti se razvijaju iz epidermalnih matičnih stanica te se diferenciraju u različite tipove pozitivnom regulatornom petljom Foxi3a/-3b i drugim transkripcijskim faktorima (Hwang i Chou 2013).

Ionociti su stanice bogate mitohondrijima koje izražavaju specifične ionske transportere u škragama koji unose Na^+ , Cl^- i Ca^{2+} ione, izlučuju H^+ ili HCO_3^- te izbacuju amonijak. Identificirano je pet takvih ionocita: H^+ -ATPazom bogati ionociti, Na^+ - K^+ -ATPazom bogati ionociti, ionociti koji izražavaju Na^+ - Cl^- kontransporter, K^+ sekretorne stanice i stanice koje izražavaju SLC26 porodicu prijenosnika otopljenih tvari (Guh i sur. 2015). Analogni su transportnim stanicama u različitim dijelovima bubrega sisavaca u vidu ekspresije i funkcije ionskih transportera. Fiziologija i regulacija epitelnih ionskih transportera može se istraživati na *in vivo* modelu jer su ionociti u koži embrija direktno izloženi okolišu te je promjene moguće promatrati *in situ* bez manipulacije jedinke. Također, moguće je pratiti promjene u funkciji transportera ili ionocita jedinki kojima je modificirana ekspresija gena u razdoblju od 1. do 5. dana nakon oplodnje te je moguće inkubirati embrije ili odrasle jedinke u medije sa različitim ionskim sastavom radi istraživanja uloge specifičnih iona i transportera (Hwang i Chou 2013).

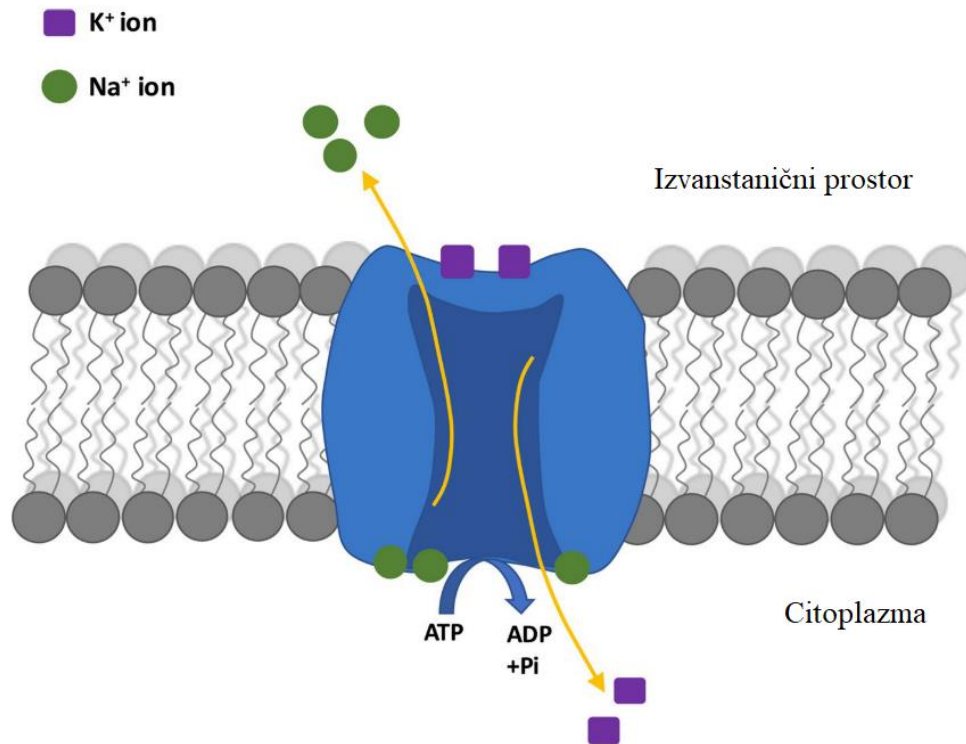
5. Istraživanja lokalizacije i ekspresije proteina Na^+/K^+ -ATPaze u ribi zebrici

5.1. Struktura i lokalizacija proteina Na^+/K^+ -ATPaze

Na^+/K^+ -ATPaza je integralni membranski protein odgovoran za održavanje elektrokemijskog potencijala natrijevih i kalijevih iona duž plazmatske membrane životinjskih stanica (Rajarao i sur. 2001). Sastoji se od α , β i FXYD podjedinice od kojih svaka sadrži nekoliko izoformnih oblika.

Osnovna funkcija natrij-kalij pumpe ovisit će o unutarnjim dijelovima gdje se događa transport iona kao odgovor na hidrolizu ATP-a, dok će raznolikosti na površini proteina omogućavati svakoj izoformi različite protein-protein interakcije (Clausen i sur. 2017). Podjedinica α veličine je ~ 110 kDa, sadrži ATP vezujuće mjesto, mjesto za fosforilaciju i stanične receptore za srčane glikozide (inhibitori Na^+/K^+ -ATPaze) te je odgovorna za transport enzima. Podjedinica β je glikozilirani transmembranski protein veličine ~ 55 kDa koji povećava translaciju i stabilnost α podjedinice. Protein FXYP modificira afinitet za Na^+ i K^+ ione i ATP, kinetiku pumpe i transport te pridodaje stabilnosti Na^+/K^+ -ATPaze. Obje podjedinice, α i β , pripadaju velikoj superobitelji transmembranskih proteina P-tipa. Stanična membrana više je propusna za K^+ ione nego za Na^+ ione stoga postoji veća tendencija za pasivnim gubitkom K^+ iona što rezultira negativnim nabojem membrane u stanju mirovanja. Unutar stanica veća je koncentracija K^+ iona nego izvan, dok je koncentracija Na^+ iona veća izvan stanica nego unutar. Protein Na^+/K^+ -ATPaza održava elektrokemijski potencijal plazmatske membrane aktivnim prijenosom iona suprotno koncentracijskom gradijentu pri čemu iz stanice izbacuje 3 Na^+ iona, a unosi 2 K^+ iona uz potrošnju ATP-a (Slika 10) (Pivovarov i sur. 2019).

Zebrica sadrži puno različitih izoformi α i β podjedinice. Identificirano je pet $\alpha 1$ gena, jedan $\alpha 2$ i dva $\alpha 3$ gena ove podjedinice i 6 različitih gena β podjedinice čije su lokalizacije tkivno-specifične (Canfield i sur. 2002). Membranski protein Na^+/K^+ -ATPaza do sada je lokaliziran u kanalićima pronefrosa (Drummond i sur. 1998), crijevu (Levic i sur. 2020), u epitelnim stanicama uha ribe zebrice (Clemens Grisham i sur. 2013) te u Na^+/K^+ -ATPazom bogatim ionocitima (NKA stanice) (Zimmer i sur. 2018)



Slika 10. Mehanizam natrij-kalijeve pumpe koja potrošnjom ATP-a izbacuje iz stanice 3 Na⁺ iona, a unosi 2 K⁺ iona (Pivovarov i sur. 2019).

5.2. Lokalizacija i ekspresija $\alpha 1$ podjedinice proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u tkivima ribe zebrice

Istraživanja transkriptoma pokazala su tkivno-specifične lokalizacije 14 podjedinica Na⁺/K⁺-ATPaze u tkivima ribe zebrice (Canfield i sur. 2002; Rajarao i sur. 2001). Tkivno-specifična ekspresija α i β podjedinica prisutna je u mozgu, kralježnici, olfaktornom plakodu, ušnom vezikulu, ionocitima, mukoznim stanicama, srcu, pronefrosu, leći i skeletnim mišićima (Canfield i sur. 2002; Liao i sur. 2009). Pet gena α podjedinice pripada $\alpha 1$ genskoj potporodici, od kojih se njih četiri (*atplala.1-atplala.4*) nalaze na istom kromosomu što je vjerojatno posljedica tandemskih duplikacijskih događaja (Blasiolo i sur. 2002). Osim pet $\alpha 1$ gena, identificirana su još dva $\alpha 3$ gena i gen ortologan $\alpha 2$ genu sisavaca. Također, postoji još 6 gena β podjedinice. Sve navedene α i β podjedinice postaju transkripcijski aktivne sredinom somitogeneze (Canfield i sur. 2002).

Svaki od pet gena $\alpha 1$ podjedinice daje jedinstvenu ekspresiju što posljedično uzrokuje funkcionalne razlike među njima (Blasiolo i sur. 2002). Također, tandem ponavljajući geni *atp1a1a.1-atp1a1a.5* pokazuju različitu ekspresiju tijekom embrionalnog razvoja (White i sur. 2017). Ekspresija mRNA gena $\alpha 1a.1$ u fazi 15 somita najveća je u pronefrosu, ušnom vezikulu i mozgu. Nadalje njegova je ekspresija vidljiva kod 24 h starih zebrica u transkriptomima leće, srcu i mukoznim stanicama, a nakon 72 h vidljiva je ekspresija u posteriornom dijelu srednjeg mozga, stražnjem mozgu i kralježnici. Ekspresija $\alpha 1a.2$ gena u fazi 15 somita vidljiva je u kanalu pronefrosa te u mozgu i ušnom vezikulu s nešto nižom razinom ekspresije, a 36 h nakon oplodnje i dalje je prisutna jaka ekspresija u kanalu pronefrosa i mukoznim stanicama te manja ekspresija u leći, posteriornom dijelu srednjeg mozga i ušnom vezikulu. Bez obzira na popriličnu ekspresiju $\alpha 1a.2$ u mozgu, ne postoji ekspresija u kralježnici. Ekspresija gena $\alpha 1a.3$ vidljiva je također već u fazi 15 somita, a tijekom embrionalnog razvoja njegova je ekspresija prisutna u mozgu i kralježnici s najvećom ekspresijom u stražnjem mozgu. Ekspresija gena $\alpha 1a.4$ i $\alpha 1b$ najviše je vidljiva 36 h nakon oplodnje. Transkripti gena $\alpha 1a.4$ najviše su zastupljeni u kanalu pronefrosa i u uhu, a nešto niže razine ekspresije zabilježene su u olfaktornom plakodu i mukoznim stanicama. Gen $\alpha 1b$ najviše je izražen u mozgu i kralježnici (Canfield i sur. 2002).

Samo je jedno komercijalno dostupno protutijelo a6F specifično za $\alpha 1$ podjedinicu za gen *atp1a1* s kojim su uspješno lokalizirani kanalići pronefrosa zebrice (Drummond i sur. 1998). Pomoću protutijela a5 koji je specifičan za protein Na^+/K^+ -ATPazu kodiranu genima *atp1a1*, *atpa2*, *atp1a3* i *atp1a4* određena je lokalizacija u Na^+/K^+ -ATPazom bogatim stanicama (NKA stanice) (Zimmer i sur. 2018) i crijevu (Levic i sur. 2020), a u epitelnim stanicama uha detektiran je *ap1b1* gen β podjedinice pomoću IgG₁ NKA (a6F) protutijelom (Clemens Grisham i sur. 2013).

S obzirom da nije dostupan veliki broj protutijela koje je moguće koristiti na tkivima zebrice, važno je optimizirati načine pripreme tkivnih presjeka i uvjete imunohistokemijske metode kako bi omogućili potencijalno vezanje protutijela u drugim tkivima. S obzirom da je α podjedinica zastupljena u svim tkivima i stanicama, optimizacijom primjene a6F protutijela koje je specifično za $\alpha 1$ podjedinicu, omogućila bi se njegova veća primjena u različitim fiziološkim, razvojnim i drugim istraživanjima.

6. Metode lokalizacije proteina

6.1. Imunohistokemijske metode

Histološko bojanje je metoda koja omogućava vizualizaciju strukture tkiva i njegovih promjena stoga se vrlo često koristi u istraživanjima, dijagnostici i forenzici. Prije samog bojanja uzoraka, potrebno je uzorke fiksirati, uklopiti, rezati i ponekad ih obraditi određenom metodom otkrivanja epitopa. Hematoksilin i eozin jedne su od osnovnih boja koje se koriste u histologiji. Hematoksilin boja nukleinske kiseline što rezultira ljubičasto-plavim obojenjem struktura kao što su DNA u staničnoj jezgri, RNA u ribosomima i endoplazmatskog retikuluma. Eozin je boja koja slijedi nakon bojanja uzoraka hematoksilinom koja rezultira ružičastim obojenjima citoplazme (Gurina i Simms 2022).

Imunohistokemija je metoda određivanja lokalizacije i funkcije proteina zebrice u cjelokupnim (eng. *whole-mount*) preparatima ili u prerezima. Ovom metodom moguće je vizualizirati jako male promjene u razvoju određenih struktura ili staničnih tipova što omogućava provjeravanje cijelih linija zebrica koje nose određene mutacije. Metoda se bazira na korištenju primarnog i sekundarnog protutijela pri čemu je primarno protutijelo napravljeno u određenoj vrsti (npr. miš, zec) za protein od interesa. Primarno protutijelo nanese na preparat koji je prije toga bio inkubiran u albuminu goveđeg seruma radi sprječavanja nespecifičnog vezanja protutijela. Nakon njegove inkubacije i ispiranja, dodaje se sekundarno protutijelo napravljeno u drugoj vrsti (npr. kozi) koje prepoznaje razred imunoglobulina primarnog protutijela. Sekundarno protutijelo može biti konjugirano enzimima peroksidazom ili alkalnom fosfatazom što omogućuje detekciju mjesta vezanja protutijela (Macdonald 1999). U imunokemijskim istraživanjima, sekundarno je protutijelo najčešće konjugirano fluoroforom što omogućava detekciju proteina fluorescentnim mikroskopom (Alshammari i sur. 2016).

U cjelokupnim ili *whole-mount* preparatima ponekad je teško vizualizirati proteine zbog višeslojnosti tkiva, stoga kriopreparati daju mogućnost detaljnije vizualizacije lokalizacije proteina. Budući da su embriji zebrice vrlo osjetljivi i lako ih je oštetiti, kriopresjeci stvaraju puno manje oštećenja u tkivima prilikom rezanja i bolja su opcija od parafinskih prereza za imunofluorescencijsku analizu (Ferguson i Shive 2019). Također, kriopreparate relativno je

jednostavno i brzo napraviti, ne zahtijevaju dehidraciju kao druge tipične metode te bolje čuvaju antigenost uzoraka od parafinskih preparata. Kod izrade kriopresjeka bitno je naglo i brzo zamrzavanje koje smanjuje formiranje kristala i minimalizira štetu u tkivima. Takvi zamrznuti prerezi mogu se koristiti u imunohistokemiji, za detekciju enzima i za *in situ* hibridizaciju (Fischer i sur. 2008). Osim naglog smrzavanja, dodavanje saharoze također minimizira stvaranje kristala prilikom smrzavanja jer smanjuje količinu vode u tkivima i omogućuje stvaranje glatkih blokova tkiva za rezanje, a posljedično su i manja oštećenja tkiva (Barthel i Raymond 1991). Uz sve navedeno, prije same izrade preparata važan je izbor fiksativa koji će najbolje sačuvati integritet uzorka (Brzica i sur. 2011).

6.1.1. Metode fiksiranja i otkrivanja epitopa

Tkiva i stanice koje se koriste u imunohistokemijskim protokolima potrebno je prvo fiksirati odgovarajućim fiksativom za određeno tkivo/staničnu liniju. Od kraja 19. stoljeća, paraformaldehid (PFA) je najčešće korišten fiksativ jer je efikasniji od alkohola te se može koristiti u širokom spektru koncentracija (2 %- 10 %) bez prekomjerne fiksacije. Fiksacijom tkiva s PFA, dolazi do denaturacije proteina uz očuvanje antigenosti, ali može loše utjecati na integritet tkiva njegovim oštećenjem te zamaskirati vežuća mjesta pojedinih protutijela (epitope). Maskiranje epitopa događa se jer PFA inducira unakrsno povezivanje reaktivnih mjesta unutar jednog proteina i/ili između susjednih proteina formiranjem mostova između metilnih, amino, imino, aromatskih i drugih reaktivnih skupina. To se ne događa uvijek u jednakoj količini nego ovisi o tipu fiksativa i vrsti proteina. Također, PFA tretman može promijeniti peptide, što ovisi o aminokiselinskoj sekvenci, te kalcij i drugi dvovalentni kationi mogu formirati čvrste komplekse s proteinima tijekom fiksacije i time maskirati epitope i onemogućiti vezanje protutijela (Brzica i sur. 2011). Osim reaktivnih mjesta proteina važna je i njegova trodimenzionalna struktura prilikom fiksacije s PFA jer promjene u konformaciji proteina mogu učiniti epitope nedostupnima za vezanje protutijela. Kako bi se ovaj problem riješio, postoje različite metode otkrivanja epitopa uzoraka prije upotrebe specifičnog protutijela. Protokoli otkrivanja epitopa najčešće uključuju tretiranje tkiva zagrijavanjem na visokim temperaturama, tretiranjem različitim alkoholima, deterdžentima ili

kombinacijama ovih metoda. Zagrijavanje uzoraka na visokim temperaturama u puferima različitih pH vrijednosti često može poništiti unakrsne veze u proteinu koje nastaju procesom fiksacije. Protokoli koji uključuju zagrijavanje na visokim temperaturama i obradu alkoholom mogu biti dosta grubi za određena tkiva te se koriste za presjeke prethodno fiksirane parafinom i PFA, ali rijetko se koriste za obradu kriopreparata. Dostupnost epitopa kod kriopreparata, fiksiranih s PFA, smatra se manjim problemom nego kod parafinskih prereza. Stoga je otkrivanje epitopa kriopreparata bilo uspješno uz obradu deterdžentom (SDS, eng. *Sodium dodecyl sulfate*), bez zagrijavanja i tretiranja alkoholima. Ovakva je obrada, pomoću deterdženta SDS, dovela do odmaskiranja epitopa što je posljedično uzrokovalo bolje vezanje protutijela za svoja specifična vezna mjesta i omogućilo je jači intenzitet signala u tkivima gdje se protutijelo vezalo. Dobar protokol otkrivanja epitopa omogućuje vezanje protutijela na njegovo vezno mjesto i značajno pojačava intenzitet signala u uzorcima (Brzica i sur. 2011).

6.2. Fluorescencijska mikroskopija

Fluorescencija je proces u kojem molekula koja je bila ekscitirana, emitira određenu svjetlost (Moldoveanu i David 2013). Fluorescencijska mikroskopija temelji se na ekscitaciji uzoraka svjetlošću kratkih valnih duljina koju apsorbira filter kroz koji se promatra uzorak. Kako filter, koji apsorbira kratke valne duljine, a propušta dulje valne duljine (fluorescencija), vidljiv je signal na tamnoj površini. Imunofluorescencija omogućuje otkrivanje specifične lokalizacije proteina reakcijom antigena i protutijela pri čemu jedna od navedenih komponentni ima sposobnost fluorescencije (fluorofor) i time je vidljiva pod fluorescentnim mikroskopom (Rost 2016). Također, moguće je vizualizirati više različitih proteina u jednom uzorku korištenjem dviju, tri ili više različitih fluorofora/. Fluorescencijska mikroskopija često se koristi u biološkim i medicinskim istraživanjima. Vrlo je osjetljiva tehnika stoga je pogodna za detekciju tvari niskih koncentracija te u imunohistokemiji za detekciju tvari koje rezolucija svjetlosnog mikroskopa ne može detektirati (npr. neurotransmiteri i amini). Danas se fluorescentna mikroskopija koristi i u *in vivo* istraživanjima mjerenjem promjene fluorescentnog spektra i drugih karakteristika. Otkriće zelenog fluorescentnog proteina (engl. *green fluorescent protein*; GFP) uvelike je potaknulo korištenje

fluorescentnog mikroskopa u istraživanjima. Molekula GFP je manje štetna u stanicama od fluorescentnih proba koje su često toksične, stoga se on koristi u praćenju određenih proteina u *in vivo* modelima. Takve analize omogućile su razumijevanje bioloških procesa kao što su slaganje proteina, transport proteina i dinamika RNA (Rost 2016).

7. Cilj istraživanja

Kako je trenutno malo dostupnih protutijela koja se mogu koristiti na tkivima ribe zebrice, veoma je važna optimizacija protokola njihovog korištenja koja bi omogućila njihovo vezanje za specifična vezujuća mjesta. Protutijelo a6F jedno je od komercijalno dostupnih protutijela, čija primjena na kriopreparatima nije optimizirana, stoga je naša pretpostavka da bi optimizacija fiksacije uzoraka i optimizacija protokola otkrivanja epitopa pokazala već postojeće i potencijalne nove lokalizacije $\alpha 1$ podjedinice proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u kriopreparatima ribe zebrice. Također, pregledavanjem postojeće literature (Abbas i Whitfield 2009; Blasiolo i sur. 2002, 2003; Geng i sur. 2013), pretpostavljamo da postoji razvojno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice navedenog proteina.

Stoga, specifični ciljevi ovog diplomskog rada su:

- 1) optimizirati postupak fiksacije embrija ribe zebrice,
- 2) odrediti optimalne uvjete otkrivanja epitopa za provođenje imunofluorescencijske analize protutijelom a6F za $\alpha 1$ podjedinicu membranskog proteina Na⁺/K⁺-ATPaze,
- 3) optimizirati razrjeđenje protutijela a6F za praćenje promjene ekspresije $\alpha 1$ podjedinice proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u tkivima zebrice,
- 4) istražiti lokalizacije $\alpha 1$ podjedinice proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u različitim tkivima zebrice,
- 5) istražiti razvojno-uvjetovanu ekspresiju $\alpha 1$ podjedinice proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u različitim tkivima zebrice.

8. Materijal i metode

8.1. Materijal

8.1.1. Pokusne životinje

- Ribe vrste *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska).
- E3 Medij za razvoj embrija (50x, čuvan pri temperaturi + 4 °C, pH = 7,8)
 - 7,305 g NaCl, 250 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 0,317 g KCl, 8,5 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 0,916 g CaCl₂, 16,5 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 0,993 g MgSO₄, 16,5 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 500 mL deH₂O

8.1.2. Pufferi, otopine i kemikalije

8.1.2.1. Fiksacija i rezanje embrija zebrića kriomikrotomom

- Paraformaldehid (PFA): 4 % otopina u 1x PBS pufferu:
 - 20 g PFA (Sigma, SAD)
 - 500 mL 1x PBS
- 1xPBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*), pH=7,4:
 - 100 mL deH₂O
 - 900 mL 10x PBS
- 10xPBS, pH=7,4:
 - 1 L deH₂O
 - 2,01 g KCl (Kemika, Hrvatska)
 - 2,72 g KH₂PO₄ (Kemika, Hrvatska)

- 11,59 g Na₂HPO₄ (Kemika, Hrvatska)
- 79,46 g NaCl (kuhinjska sol, kupovna)
- BT fiksativ:
 - 4 % paraformaldehid (PFA)
 - 0,15 mM CaCl₂
 - 4 % saharoza u 0,1 M PO₄ puferu
- PBSt, pH 7,4: 1x PBS koji sadrži koji sadrži 0,1 % neionskog surfaktanta Tween 20:
 - 1 L 1x PBS
 - 1 mL Tween 20 (Calbiochem, SAD)
- Natrijev azid (NaN₃), 20 % otopina u deH₂O:
 - 20 g NaN₃ (Fisher Scientific, SAD)
 - 100 mL deH₂O
- Saharozna: 30 % otopina u 1x PBS puferu sa 0,02 % NaN₃:
 - 30 g saharoza (Fisher Scientific, SAD)
 - 100 mL deH₂O
 - 100 μL 20 % NaN₃
- Smjesa komercijalno dostupne 2,5 % goveđe želatine i 25 % saharoze u deH₂O sa 0,02 % NaN₃ (IMI, Hrvatska)
 - 2,5 g komercijalno dostupna mljevena bijela goveđa želatina (dr. Oetker, Njemačka)
 - 25 g saharoza
 - 100 mL deH₂O
 - 100 μL 20 % NaN₃

- Polimerni medij za uklapanje O.C.T. (engl. *Optimal Cutting Temperature*) (Leica Biosystems, Njemačka)

8.1.2.2. Imunofluorescencijska i histokemijska analiza

- 1x PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*), pH 7,4:
 - 7,95 g NaCl, 140 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 200 mg KCl, 2,7 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 1,14 g Na₂HPO₄, 8 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 272 mg KH₂PO₄, 2 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 1 L deH₂O
- 1x PBS s velikim udjelom soli (eng. *High salt PBS*)
 - 9 g NaCl (Kemika, Hrvatska)
 - 500 mL deH₂O
- Triton-X-100: 0,1 %; 0,5 % i 2 % otopina u 1x PBS puferu:
 - 0,1 g, 0,5 g ili 2 g Triton-X-100 (Merck, Njemačka)
 - 100 mL 1x PBS
- Vectashield: 25 % otopina za očuvanje fluorescencije u puferu za pripremu 10 % gela za razdvajanje proteina:
 - 300 μL Vectashield (Vector Laboratories, SAD)
 - 900 μL pufera za pripremu 10 % gela za razdvajanje proteina (recept u nastavku)
- SDS (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate*): 1 % otopina u deH₂O:
 - 1 g SDS (Sigma, SAD)
 - 100 mL deH₂O
- 1x PBS + NaN₃: 0,02 % NaN₃ u 1x PBS-u

- 1 mL (20 %) NaN₃ (Fisher Scientific, SAD)
 - 1 L 1xPBS
- 1 % otopina BSA (eng. *Bovine serum albumin*)
 - 1 g BSA (Sigma, SAD)
 - 100 ml deH₂O
- Ksilen (Kemika, Hrvatska)
- Propanol (Kemika, Hrvatska)
- 98 % etanol (Kemika, Hrvatska)
- 75 % etanol
 - 783 mL 96 % etanol (Kemika, Hrvatska)
 - 217 mL deH₂O
- 60 % etanol
 - 630 mL 96 % etanol (Kemika, Hrvatska)
 - 370 mL deH₂O
- Citratni puferi:

Pufer pH = 9

 - 2,94 g natrijev citrat
 - 1 L deH₂O

Pufer pH = 3

 - 2,1 g limunska kiselina – monohidrat
 - 1 L deH₂O

Pufer pH = 6

 - Pufer A + B (u istom omjeru)
 - Titirati s NaOH (5N) ↑ pH
 - HCl (10%) ↓ pH
- Histološke boje

Ehrlichov hematoksilin

- 40 mL H₂O
- 40 mL 100 % etanol
- 40 mL glicerol
- 4 mL ledena (bezvodna) octena kiselina
- 0,8 g hematoksilin
- > 5 g kalijev aluminijev sulfat (Alum, AlK[SO₄]₂ x 12 H₂O) – u suvišku

Eozin

- 0,3 g eozin
- 6,2 ddH₂O
- 24,62 mL 98 % etanol
- 92,46 mL 80 % etanol
- 0,62 mL ledena (bezvodna) octena kiselina

8.1.2.3. Cjelokupni preparati (eng. *whole-mount*)

- PBSt, pH 7,4: 1x PBS koji sadrži koji sadrži 0,1 % neionskog surfaktanta Tween 20:
 - 1 L 1x PBS
 - 1 mL Tween 20 (Calbiochem, SAD)
- Dentov fiksativ
 - 80 % metanol
 - 20 % DMSO (dimetil sulfoksid)
- 5 % otopina BSA (eng. *Bovine serum albumin*)
 - 5 g BSA (Sigma, SAD)
 - 100 ml deH₂O

8.1.2.4. Western blot

Tablica 1. Sastojci za pripremu SDS-poliakrilamidnih gelova za elektroforezu.

5 %	18 %	10 %	Sabijajući gel
6,93 ml dH ₂ O	1,73 ml dH ₂ O	3,21 ml dH ₂ O	5,144 ml dH ₂ O
2 ml akrilamid	7,2 ml akrilamid	3 ml akrilamid	0,8 ml akrilamid
3 ml razdvajajući pufera	3 ml razdvajajući pufera	2,25 ml pufer A za elektroforezu	2 ml sabijajući pufer
60 µl APS 10 %	60 µl APS 10 %	450 µl APS	40 µl APS 10 %
8 µl Temed	8 µl Temed	2,4 µl Temed	16 µl Temed
		90 µl SDS 10 %	

- Razdvajajući pufer – za 500 ml ukupnog volumena; pH 8,8
 - 90,75 g TRIS (*electrophoresis grade*), (Sigma Aldrich, SAD)
 - 2 g SDS (*electrophoresis grade*), (Carl Roth, Njemačka)
 - mQ H₂O do 500 ml
- Sabijajući pufer – za 500 ml ukupnog volumena; pH 6,8
 - 30,3 g TRIS (*electrophoresis grade*), (Sigma Aldrich, SAD)
 - 2 g SDS (*electrophoresis grade*), (Carl Roth, Njemačka)
 - mQ H₂O do 500 ml
- Tris-Glicin 10x
 - 30 g Tris (Sigma Aldrich, SAD)
 - 144 g Glicin (Sigma Aldrich, SAD)
 - dH₂O do 1 L

- Pufer za elektroforezu
 - 100 ml Tris-Glicine 10x
 - 800 ml dH₂O
 - 5 ml SDS 20 % (Carl Roth, Njemačka)
- Transfer pufer
 - 100 ml Tris-Glicine 10x
 - 700 ml dH₂O
 - 200 ml metanol (Kemika, Hrvatska)
 - 5 ml SDS 20 % (Carl Roth, Njemačka)
- 10x TBS – pH 7,6
 - 24 g Tris (Sigma Aldrich, SAD)
 - 88 g NaCl (Kemika, Hrvatska)
 - dH₂O do 1 L
- 1x TBST
 - 100 ml 10x TBS
 - 900 ml dH₂O
 - 1 ml Tween 20
- 20 % SDS
 - 20 g SDS (*electrophoresis grade*)
 - mQ dH₂O do 100 ml
- Pufer A za elektroforezu
 - 18,17 g TRIS (Sigma Aldrich, SAD)
 - 100 ml deH₂O
- Laemmli pufer 5x – ukupni volumen 20 ml
 - 2 g SDS (*electrophoresis grade*)
 - 10 ml glicerol
 - 5 ml Tris-HCL (pH 6,8) 1M
 - 50 mg bromfenol plavo

- 5 % mlijeko za blokiranje
 - 2,5 g mlijeka u prahu (*blotting grade*), (Carl Roth, Njemačka)
 - 50 ml 1x TBST
- 2,5 % BSA u 1x TBST
 - 2,5 g BSA (*blotting grade*), (Carl Roth, Njemačka)
 - 100 ml 1x TBST

8.1.2.5. Peptidi i protutijela za imunofluorescencijske i histokemijske analize

- Primarno protutijelo: protutijelo za protein $\alpha 1$ podjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze (Na^+/K^+ -Ab) – monoklonsko protutijelo proizvedeno u stanicama miša upotrebom imunizirajućeg peptida N-terminalnog kraja proteina Na^+/K^+ -ATPaza (slijed aminokiselina između 27-55); 43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a6F, *Developmental Studies Hybridoma Bank*, Sveučilište Iowa, SAD)
- Sekundarno protutijelo: DAM–CY3 (engl. *Donkey Anti-Mouse-CY3*) – magareće protutijelo protiv imunoglobulina klase G (IgG) miša obilježeno fluorescencijskom bojom CY3; 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD)
- Sekundarno protutijelo (Western blot, analiza kemijskom iluminiscencijom): zečje protutijelo protiv imunoglobulina klase G (IgG) miša obilježeno peroksidazom; 10,0 – 20,0 mg/ml (Sigma-Aldrich, SAD)
- Sekundarno protutijelo (Western blot, analiza otopinom sa supstratom): GAM-AP – kozje protutijelo protiv imunoglobulina klase G (IgG) miša obilježeno alkalnom fosfatazom

8.1.3. Laboratorijska oprema i potrošni materijal

- Jednokratni plastični kriokalupi 25mm x 20 mm x 5 mm (Adwin Scientific, SAD)
- Svjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka)
- Fluorescencijski mikroskop: OPTON III RS (Opton Feintechnik, Njemačka)

- Digitalna kamera za fluorescencijski mikroskop: Spot RT (Diagnostic Instruments Inc., SAD)
- Konfokalni mikroskop: Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka)
- Uređaj za analizu gelova kemijskom iluminiscencijom: ChemiDoc XRS+ Imager (BioRad, SAD)
- Kriomikrotom: Leica CM 1850 (Leica Instruments, Njemačka)
- Nož za kriomikrotom: High Profile Disposable Blade Leica 818 (Leica Biosystems, Njemačka)
- Hladnjaci (4 °C) i zamrzivači (-20 °C i -80 °C)
- Računalo
- Digestor
- Tehnička vaga
- Analitička vaga
- Vibracijska miješalica: Genie 2 Vortex (Fisher Scientific, SAD)
- Orbitalna mješalica: Thermolyne BIG BiII Orbital Shaker (Thermolyne, SAD)
- Automatske pipete s promjenjivim volumenom (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL i 100-1000 µL) (Eppendorf, Njemačka)
- Nastavci za pipete (10, 20, 100, 200, 1000 µL) (Eppendorf, Njemačka)
- Pokrovna stakalca Menzel-Glaser (Thermo Scientific: Menzel-Glaser, SAD)
- Predmetna stakalca Superfrost/Plus (Thermo Scientific: Menzel-Glaser, SAD)
- Kutije za mikroskopska stakalca (Heathrow Scientific, SAD)

8.1.4. Računalni programi

- SPOT RT v3.4 (Diagnostic Instruments Inc., SAD)
- ImageJ/FIJI 1.53c (<http://imagej.nih.gov/ij/>)
- Statistica 14.0.0.15 (<http://tibco.com>)

8.2. Metode

8.2.1. Uzgoj i uzorkovanje pokusnih životinja

Za potrebe ovog istraživanja koristila sam spolno nezrele (1.-5. dana nakon oplodnje) ribe vrste *Danio rerio*. Nastamba za ribe zebrice (*Danio rerio*) nalazi se u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković (IRB). Svi pokusi na životinjama su odobreni od Etičkog povjerenstva IRB, Nacionalnog povjerenstva za dobrobit životinja i Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske prilikom odobravanja znanstveno-istraživačkog projekta DANIOTRANS (HRZZ-IP-2019-04-1147), voditelj: dr.sc. Tvrtko Smital) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost. Uzorkovala sam 20 jedinki u svakoj od 5 starosnih skupina koje su činili embriji razvojnog stadija 24 h i 48 h nakon oplodnje i ličinke razvojnog stadija 72 h, 96 h i 120 h nakon oplodnje. Embrijima razvojnog stadija 24 h i 48 h ručno je uklonjen korion. Također je bilo uzorkovano 100 jedinki za Western blot analizu i 6 odraslih jedinki uzorkovanih od strane stručnog osoblja Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković i Jedinice za molekularnu toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.

Ribe se uzgajaju u standardnim uvjetima u vodi konstantne temperature 27-29 °C u akvarijskom sustavu PP-Module (AquaSchwarz, Njemačka). pH vode je 7-8,2, konduktiviteta 1000-12000 µS , a uvjeti svjetla i tame u odnosu su 14 h:10 h. Akvarijski sustav koristi vodu dobivenu reverznom osmozom vodovodne vode s dodatkom smjese soli za akvarije. Prije ponovnog ulaska u akvarijski sustav, korištena voda prolazi kroz filtere s porama veličine 120 i 50 µm, biološki filter (Siporax) koji razgrađuje organske dušikove spojeve, apsorpcijski filter s aktivnim ugljenom te se dezinficira ultraljubičastim filterom. Ribe se hrane jednom dnevno standardnom hranom odgovarajuće veličine (Gemma Micro, Skretting, Francuska). Stručno je

osoblje, gore navedenog laboratorija Instituta Ruđer Bošković, stavljalo ujutro na mrijest jedinke stare 1-1,5 godinu u omjeru muški i ženski spol 3:1. Embriji su zatim bili premješteni u petrijevku u E3 medij u inkubator na 28 °C.

8.2.2. Fiksacija i izrada kriopreparata embrija ribe zebrice

Za pripremu kriopreparata koristila sam modificirani protokol za uzastopnu imunofluorescenciju i imunohistokemijsku analizu kriopreparata (Ferguson i Shive 2019) prilikom čega sam koristila dvije različite otopine za fiksaciju uzoraka: 4 % PFA i BT fiksativ. Zebrice razvojnih stadija 1-5 dana (N=20/skupini) fiksirala sam u 4 % PFA i BT fiksativu 1 h na sobnoj temperaturi u epicama od 1,5 mL. Zatim sam ih isprala 2 puta po 5 minuta pomoću 1x PBSt-a. Nakon toga sam uklonila PBSt i inkubirala uzroke u 1mL 30 % saharoze u otopini 1x PBS + 0,02% NaN₃ na klackalici tijekom 1 h. Zatim sam uzorke na klackalici inkubirala 1 h, ili preko noći, u 1 mL smjese 2,5 % komercijalne goveđe želatine i 25 % saharoze u otopini 1x PBS + 0,02% NaN₃. U jednokratne plastične kriokalupe dodala sam O.C.T. medij do polovice kriokalupa te u njega uronila i orijentirala embrije u željeni položaj. Tako pripremljene uzorke zamrzнула sam na -70°C tijekom 5 min. Na tako smrznute uzorke dodala sam O.C.T. medij pazeći da ispunim kriokalup do vrha. Kriokalup sa uzorcima sam potom stavila na -20°C u kriomikrotom do potpunog zamrzavanja uzoraka i medija (oko 10 min). Zamrznuti blok O.C.T medija sa uzorcima sam potom izvadila iz kriokalupa i odrezala bočne višak medija. Potom sam pripremljeni blok sa uzorcima vertikalno postavila na metalni nosač za rezanje u kriomikrotomu. Nosač sam stavila u kriomikrotom na -20 °C (oko 10 min). Uvijek sam uzorke zebrice istog razvojnog stadija pripremala u zasebnim kriokalupima. Uklopljene uzorke sam zatim poprečno rezala pomoću kriomikrotoma pri temperaturi od -20 °C na debljinu od 8 µm jednokratnim nožem za kriomikrotom. Poprečne presjeke tkiva zebrice sam zatim prikupila na predmetna stakalca Superfrost/Plus. Pripremljene kriopreparate sam potom osušila na zraku pri sobnoj temperaturi tijekom 1-2 min te pospremila u kutiju za mikroskopska stakalca u hladnjak pri temperaturi + 4 °C do upotrebe.

8.2.3. Imunofluorescencijska analiza

Za potrebe istraživanja detaljne lokalizacije i ekspresije $\alpha 1$ podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze prvo sam odredila optimalni uvjet za korištenje primarnog protutijela a6F (DSHB) pri razrjeđenju od 1:10, na kriopreparatima zebrica (razvojnog stadija 4 i 5 dana nakon oplodnje) testirajući 9 različitih postupaka otkrivanja antigena grupiranih u dvije skupine kako slijedi:

1) Obrada uzoraka alkoholima i zagrijavanjem na visokim temperaturama

Za obradu kriopreparata zebrica u ovoj skupini koristila sam 6 različitih uvjeta koji obuhvaćaju: 1) obradu alkoholima i zagrijavanje u citratnim puferima pH 3, 6 i 8; i 2) obradu zagrijavanjem u citratnim puferima pH 3, 6 i 8 koja započinje rehidracijom u 1x PBS-u 15 minuta bez prethodne obrade alkoholima.

Tablica 2. Detaljan opis protokola za otkrivanje epitopa obradom u:

1) alkoholima i/ili 2) zagrijavanjem u citratnim puferima pH 3, 6 i 8.

	OTOPINA	VRIJEME (min)	
	Ksilen	30	
	Propanol	5	
	98 % etanol	5	
	75 % etanol	5	
	60 % etanol	5	
	reH ₂ O	5	
	1x PBS	15	
	Kuhanje u mikrovalnoj pećnici (800W) u puferima pH 3, 6 i 8	5	
	Hlađenje na sobnoj temperaturi	20	
	1x PBS	3x 5	
1)	0,5 % triton	15	
	2 % triton	30	
	1x PBS	2x 5	
	1 % BSA + 0,02 % NaN ₃ u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi	30	
	Primarno protutijelo (a6F) u vlažnoj komori na +4 °C	preko noći	2)
	0,1 % triton	10	
	1x PBS	5	
	Sekundarno protutijelo DAM-CY3 (razrjeđenje 1:400) u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi	60	
	0,1 % triton	10	
	1x PBS	2x 5	
	3-10 μL medija za očuvanje fluorescencije (Vectashield)		

2) Obrada uzoraka deterdžentima:

Za obradu kriopreparata zebrića u ovoj skupini koristila sam 3 različita uvjeta koji obuhvaćaju:

1) obradu uzoraka deterdžentom SDS (1 %) ili bez obradu uzoraka bez SDS-a, te 2) obradu uzoraka deterdžentom Triton-X-100.

Tablica 3. Detaljan opis protokola za otkrivanje epitopa obradom deterdžentom SDS (1 %) i bez SDS-a.

OTOPINA	VRIJEME (min)
1x PBS	10
1-2 kapi SDS-a ili 1-2 kapi 1x PBS (bez SDS-a)	5
1x PBS	2x 5
1 % BSA + 0,02 % NaN ₃ u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi	30
Primarno protutijelo (a6F) u vlažnoj komori na +4 °C	preko noći
1x PBS s visokim udjelom soli (eng. <i>High salt</i> PBS)	2x 5
1x PBS	2x 5
Sekundarno protutijelo DAM-CY3 (razrjeđenje 1:400) u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi	60
1x PBS s velikim udjelom soli (eng. <i>High salt</i> PBS)	2x 5
1x PBS	2x 5
3-10 µL medija za očuvanje fluorescencije (<i>Vectashield</i>)	

Tablica 4. Detaljan opis protokola za otkrivanje epitopa obradom uzoraka deterdžentom Triton-X-100.

OTOPINA	VRJEME (min)
1x PBS	15
0,1 % triton	10
1x PBS	10
Primarno protutijelo (α6F) u vlažnoj komori na +4 °C	preko noći
1x PBS	10
Sekundarno protutijelo DAM-CY3 (razrjeđenje 1:400) u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi	60
0,1 % triton	10
1x PBS	10
3-10 μL medija za očuvanje fluorescencije (<i>Vectashield</i>)	

Provođenjem svakog od navedenih protokola, na kraju sam, prilikom dodavanja medija za očuvanje fluorescencije (*Vectashield*), svaki preparat preklopila pokrovnim stakalcem kojeg sam učvrstila lakom za nokte.

8.2.4. Razvojno-ovisna ekspresija proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u bubregu (pronefrosu) ribe zebrice

Za potrebe istraživanja o razvoju ovisne ekspresije Na⁺/K⁺-ATPaze u bubregu (pronefrosu) ribe zebrice koristeći prethodno utvrđen optimalni uvjet za otkrivanje antigena za protein α1 podjedinicu Na⁺/K⁺-ATPaze odredila sam optimalno razrjeđenje protutijela bilježeći intenzitete fluorescencijskog signala u rasponu serijskih razrjeđenja od 1:10 – 1:5120. Određeno optimalno razrjeđenje ovog protutijela sam potom koristila za određivanje promjena ekspresije navedenog proteina u bubrezima ribe zebrice kod različitih razvojnih stadija (1.-5. dan nakon oplodnje; N=20/skupini).

8.2.5. Histološko bojanje

Nakon provedbe imunofluorescencijske analize proteina Na^+/K^+ -ATPaze upotrebom fluorescencijskog mikroskopa, nježno sam uklonila pokrovno stakalce natapanjem u otopini 1x PBS minimalno 5 min. Pokrovno stakalce sam uklonila laganim pomicanjem predmetnog stakalca lijevo-desno u otopini 1x PBS. Nakon uklanjanja pokrovnice, kriopreparat sam isprala u čistoj otopini 1x PBS 15 min i inkubirala u nekoliko kapi histološke boje hematoksilina tijekom 5, 10, 15, 25 i 30 min. Nakon toga uzorke sam isprala 3x 5 min u 1x PBS-u i inkubirala u histološkoj boji eozin tijekom 5, 10, 15, 25 i 30 min te isprala 3x 5 min u 1x PBS-u. Uzorke sam zatim pokrila pokrovnim stakalcem u ~3-10 μL deH₂O.

8.2.6. Priprema cjelokupnih ili *whole-mount* preparata

Prilikom pripreme cjelokupnih preparate riba zebrica razvojnih stadija u rasponu između 24 h-120 h (n=10), embrijima sam po potrebi uklonila korion te sam ih potom fiksirala koristeći 24 h u 4 % PFA, BT i Dent fiksativu pri sobnoj temperaturi. Uzorke sam isprala od fiksativa pomoću PBSt-a 3x 5 min, inkubirala/blokirala s 5 % BSA u PBSt-u 1 h pri sobnoj temperaturi i zatim inkubirala preko noći pri 4 °C u 250 μl primarnog protutijela a6F (1:10) u 1x PBS + 0,02 % NaN₃. Sljedeći su dan uzorke sam ispirala u PBSt-u 3x 10 min te inkubirala preko noći pri 4 °C u 250 μl sekundarnog protutijela DAM-CY3 (1:400). Nakon inkubacije uzorke sam ispirala 3x 5 min s PBSt-om pri sobnoj temperaturi, a potom poslagaala na predmetno stakalce u 3 μl medija za očuvanje fluorescencije (*Vectashield*) unutar prstena od vazelina. Tako pripremljene uzorke sam pokrila pokrovnim stakalcem na način da sam stakalce pritisnula okomito do trena kada se uzorci ribe zebrice više nisu mogli slobodno micati.

8.2.7. Western blot

Western blot radila sam na dva različita načina pri čemu su glavne razlike činile vrsta SDS-poliakrilamidnog gela, tip uzoraka i metoda detekcije. Sve uzorke pripremlilo je stručno osoblje Jedinice za molekularnu toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada i Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković.

1) Western blot – detekcija proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u uzorcima 5 dana starih zebrica pomoću otopine sa supstratom

Uzorke embrija starih 5 dana kuhala sam na 37°C 30 min, na 65°C 15 min i na 95°C 5 min te sam u svaki od njih dodala β-merkaptotanol. Drugi dio uzoraka pripremila sam kuhanjem na istim temperaturama kao što je navedeno, ali nisam dodala β-merkaptotanol. Također, jedan uzorak sam pripremila bez kuhanja sa β-merkaptotanol i bez njega.

Na 10 % gel, koji je bio uronjen u pufer za elektroforezu, nanjela sam 22-24 μl uzorka (13-15 ug proteina) 5 dana starih zebrica pomoću Hamiltonove šprice te sam pokrenula elektroforezu na 100 V 1 h i 45 min, odnosno dok boja nije do kraja iscurila iz gela. Zatim sam PVDF (poliviniliden difluorid; PVDF) membranu stavila prvo u metanol, a potom u transfer pufer. Gelove sam izvadila odvajajući manje tanko staklo od debljeg i većeg stakla pri tome pazeći na njegovu orijentaciju te sam ga stavila u transfer pufer. Mokri transfer radila sam u kadici tako da je sav materijal bio natopljen, a kalup za sastavljanje sendviča za transfer okrenula sam svjetlom stranom prema dolje na koju sam prvo stavila tkaninu, zatim 2 filter papira, membranu, gel, još 2 filter papira i tkaninu, pri tome pazeći da ne uđe zrak u slojeve između te sam cijelo vrijeme sve slojeve držala uronjenima u hladni transfer pufer. Sklopljene sendviče stavila sam u spremnik za transfer (crnom stranom prema crnoj strani spremnika za transfer), dodala sam u kadicu hladni transfer pufer i spremnik s ledom kako ne bi došlo do zagrijavanja te pokrenula transfer na 100 V 2 h. Nakon transfera, membrane sam stavila u Comassie plavu boju na 30 sekundi i zatim u otopinu za odbojavanje 30 sekundi te nakon toga u reH₂O. Membranama sam zatim izrezala suvišne dijelove i marker koji sam pospremila u filter papir. Membrane sam potom isprala 4x 10 min u mlijeku za blot. Ispipetirala sam primarno protutijelo α6F u falkonice s blot mlijekom (1:100 razrjeđenje) te tako pripremljeno razrjeđenje ulila u posudicu s membranom i ostavila preko noći na 4°C shakeru. Sljedeći sam dan membranu isprala 4x 10 min blot mlijekom i inkubirala ga 1 h u sekundarnom protutijelu (GAM-AP) na shakeru. Nakon toga sam membranu isprala 4x 10 min blot mlijekom i 2x 5 min u 1x PBS-u na shakeru. Nakon ispiranja membranu sam prebacila u posudu sa supstratom i inkubirala ju na shakeru 45 min dok se nisu pojavili bandovi. Membrane sam zatim isprala u destiliranoj vodi i posušila ih na filter papiru.

2) Western blot - detekcija proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u tkivima odraslih jedinki ribe zebrice pomoću kemijske luminiscencije

Osim gore navedenog protokola za Western blot, koristila sam i drugi način provođenja ove metode u kojem sam koristila tkiva odraslih jedinki ribe zebrice nanoseći 12,5-15 µl uzoraka u svaku jažicu (~10 µg proteina) pomoću pipete. Svi su uzorci kao reducens sadržavali β-merkaptetanolom te su kuhani na 37°C 30 min in a 95°C 5 min.

Također ovaj se protokol osim u vrsti uzorka razlikovao u duljini trajanja transfera koji je trajao 1 h i 15 min umjesto 2 h, a blokiranje membrane pomoću blot mlijeka trajalo je 2 h umjesto 4x 10 min te je protutijelo bilo razrijeđeno u 2,5 % BSA u TTBS-u uz dodatak 0,02 % natrijevog azida, a ne u blot mlijeku kao što je gore navedeno. Membranu sam prekrila s 1 ml ECL otopine na 3 min te ju nakon toga prebacila u čistu prozirnu foliju i stavila u uređaj za kemijsku detekciju gdje sam sliku eksponirala 1 h.

8.2.8. Prikupljanje i obrada mikroskopskih slika

Uzorke sam analizirala pri povećanju od 100 i 250 puta pomoću fluorescencijskog mikroskopa OPTON III RS te sam dobivene signale u tkivima ribe zebrice poslikala digitalnom kamerom SPOT RT sa pridruženim SPOT RT v3.4 programom. Slike uzoraka obradila sam pomoću ImageJ/Fiji 1.53c programa i njegovog umetka (engl. *plugin*) ScientiFig. Pomoću Macro algoritma kojeg sam testirala na slikama sa najjačim i najslabijim intenzitetom signala obradila sam ukupno 720 slika. Svakoj sam slici oduzela pozadinsko bojanje (šum), pretvorila ih u 8-bitne zapise te uz pomoć *Otsu* algoritma i alata *Threshold* (granične vrijednosti: minimum 18 i maksimum 255) segmentirala i izmjerila intenzitet signala koji pripadaju fluorescencijskoj boji CY3, a koja je konjugirana na sekundarno protutijelo korišteno u imunohistokemijskim analizama u ovom istraživanju. Ukoliko je bilo artefakata na slikama, izbrisala sam ih ručno kako bi program što bolje segmentirao područje od interesa.

8.2.9. Prikaz i statistička obrada podataka

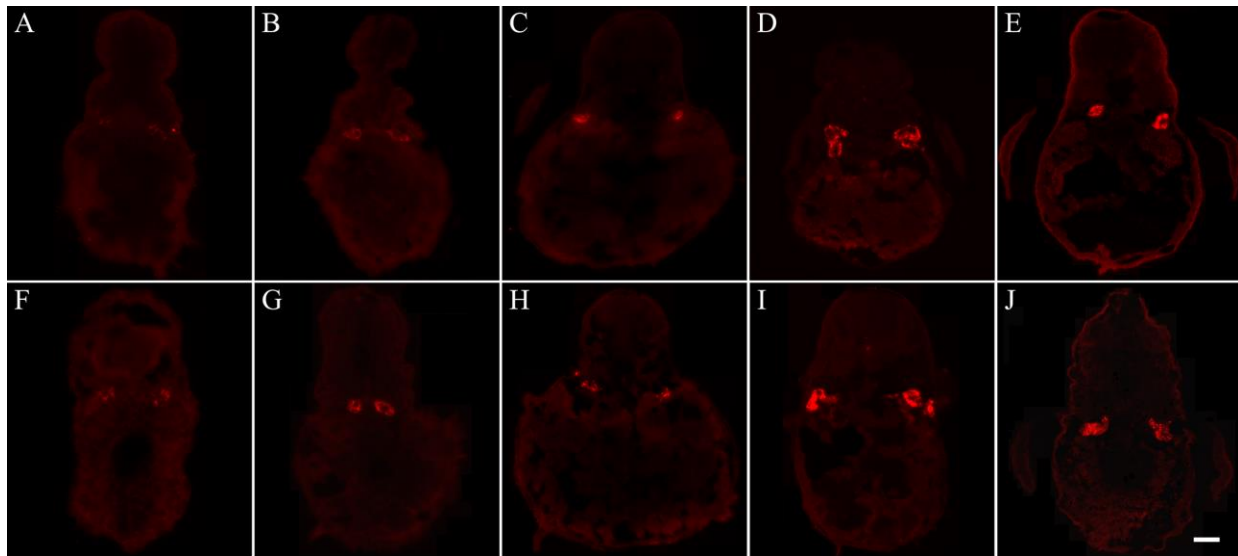
Fotografije i panele koji prikazuju lokalizaciju i ekspresijski profil proteina Na/K-ATPaze u različitim tkivima ribe zebrice obradila sam računalnim programom ImageJ/Fiji 1.53c, njegovim umetkom ScientiFig i programom Adobe Photoshop 6.0. Statističku obradu podataka napravila sam koristeći Factorial ANOVA/Duncan testova unutar računalnog programa Statistica 14 (TIBCO, SAD) uz razinu statističke značajnosti od $p < 0,05$.

9. Rezultati

9.1. Optimizacija uvjeta za lokalizaciju $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze

Dobiveni rezultati u provedenom istraživanju pokazali su da fiksiranje embrija/ličinaka tijekom 1 h koristeći BT fiksativ i 4 % PFA daju podjednako kvalitetne kriopreparate, uz minimalnu fragmentaciju tkiva (Slika 11). Također, nije bilo značajne razlike u kvaliteti uzoraka koji su bili inkubirani 1 h ili preko noći u mješavini 2,5 % komercijalne goveđe želatine i 25 % saharoze. Obrada uzoraka deterdžentom SDS (1 %) pokazao se kao optimalan uvjet otkrivanja epitopa jer je tkivo ostalo očuvano, bez morfoloških promjena i signal je u tkivima bio optimalnog intenziteta pri čemu se primarno protutijelo $\alpha 6\text{F}$ moglo koristiti u rasponu razrijeđenja od 1:10 do 1:400. Uvjeti koji su uključivali obradu organskim otapalima (alkoholima) i zagrijavanje u citratnim puferima i uvjet jednostavne obrade deterdžentom (triton) nisu se pokazali kao optimalni uvjeti zbog slabijeg signala u tkivima. Obrada uzoraka organskim otapalima i zagrijavanjem u citratnim puferima pH 3 i 8 i obrada uzoraka zagrijavanjem u citratnim puferima također pH 3 i 8 ozrokovala je trganje i oštećenje tkiva dok je zagrijavanje u citratnom puferu pH 6 dalo dobre rezultate koji su slični onima dobivenim obradom deterdžentom SDS. No zbog činjenice da je SDS protokol kraći i jednostavniji te ne uzrokuje velika oštećenja tkiva odabran je kao optimalan.

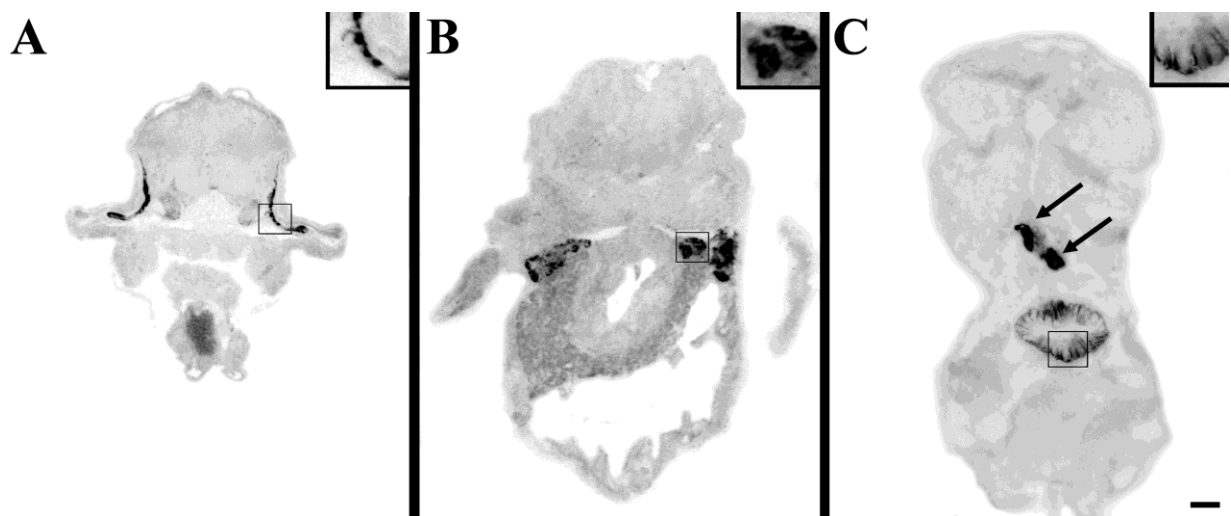
Upotreba razrijeđenja protutijela $\alpha 6\text{F}$ na kriopreparatima ribe zebrice u rasponu između 1:10-1:160 pokazala su signal/bojanje jakog intenziteta, odnosno zasićenje signala. Razrijeđenja iznad 1:400 pokazala su signal smanjenog intenziteta, dok zadnje u nizu serijskih razrijeđenja (1:5120) nije pokazivalo vidljivi signal. Stoga je razrijeđenje protutijela od 1:400 odabrano kao optimalno razrijeđenje pri kojem je intenzitet signala bio još uvijek dobro vidljiv u svim razvojnim stadijima, ali nije bio u zasićenju te je kao takav omogućio praćenje razlika u ekspresiji proteina Na^+/K^+ -ATPaze u bubregu ribe zebrice kao i manju potrošnju primarnog protutijela.



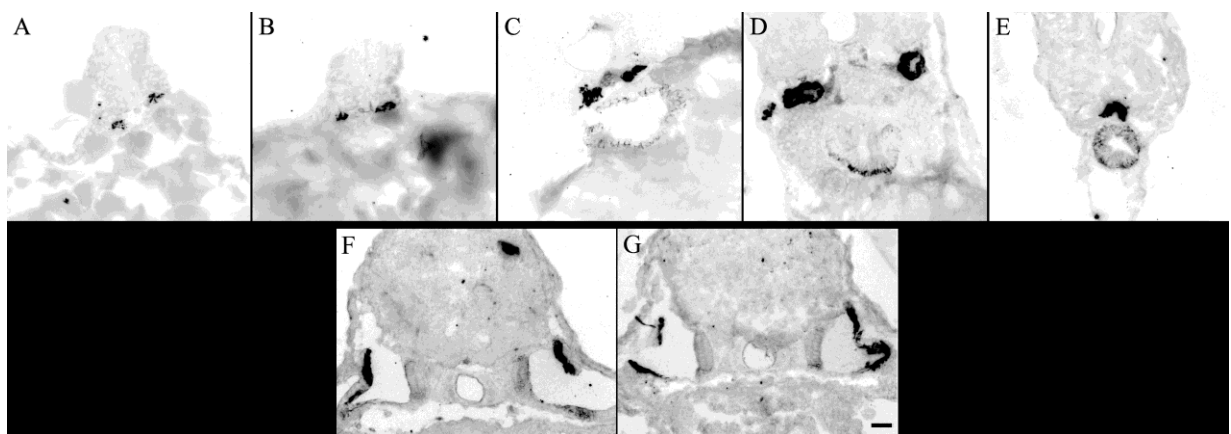
Slika 11. Slike A-E prikazuju lokalizaciju $\alpha 1$ podjedinice proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$ u predjelu pronefrosa (crveno obojenje) na kriopresjecima zebrica razvojnih stadija 24 h, 48 h, 72 h, 96 h i 120 h fiksiranih pomoću 4 % PFA, dok slike F-J prikazuju lokalizaciju navedenog proteina u pronefrosu zebrica na kriopreparatima razvojnih stadija zebrica 24 h-120 h fiksiranih pomoću BT fiksativa. Veličina mjerila je 100 μm .

9.2. Lokalizacija $\alpha 1$ podjedinice membranskog proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$ u tkivima ribe zebrice

Imunofluorescencijska analiza pomoću protutijela za $\alpha 1$ podjedinicu membranskog proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$ pokazala je lokalizaciju ovog proteina u bazolateralnoj membrani epitelnih stanica duž cijelog profila pronefrosa što uključujućuje proksimalne (zavijene i ravne), distalne i sabirne kanaliće. Također, ovaj je protein lokaliziran u bazolateralnoj membrani enterocita duž većeg dijela probavnog trakta (srednji i stražnji dio crijeva) te u bazolateralnoj membrani epitelnih stanica unutarnjeg uha (Slika 12). Navedene lokalizacije bile su vidljive u kriopreparatima u različitim stadijima razvoja: 1) u pronefrosu u svih 5 stadija razvoja (24 h-120 h), 2) u crijevu u jedinki razvojnih stadija 72 h, 96 h i 120 h i 3) u unutarnjem uhu jedinki razvojnih stadija 96 h i 120 h (Slika 13).

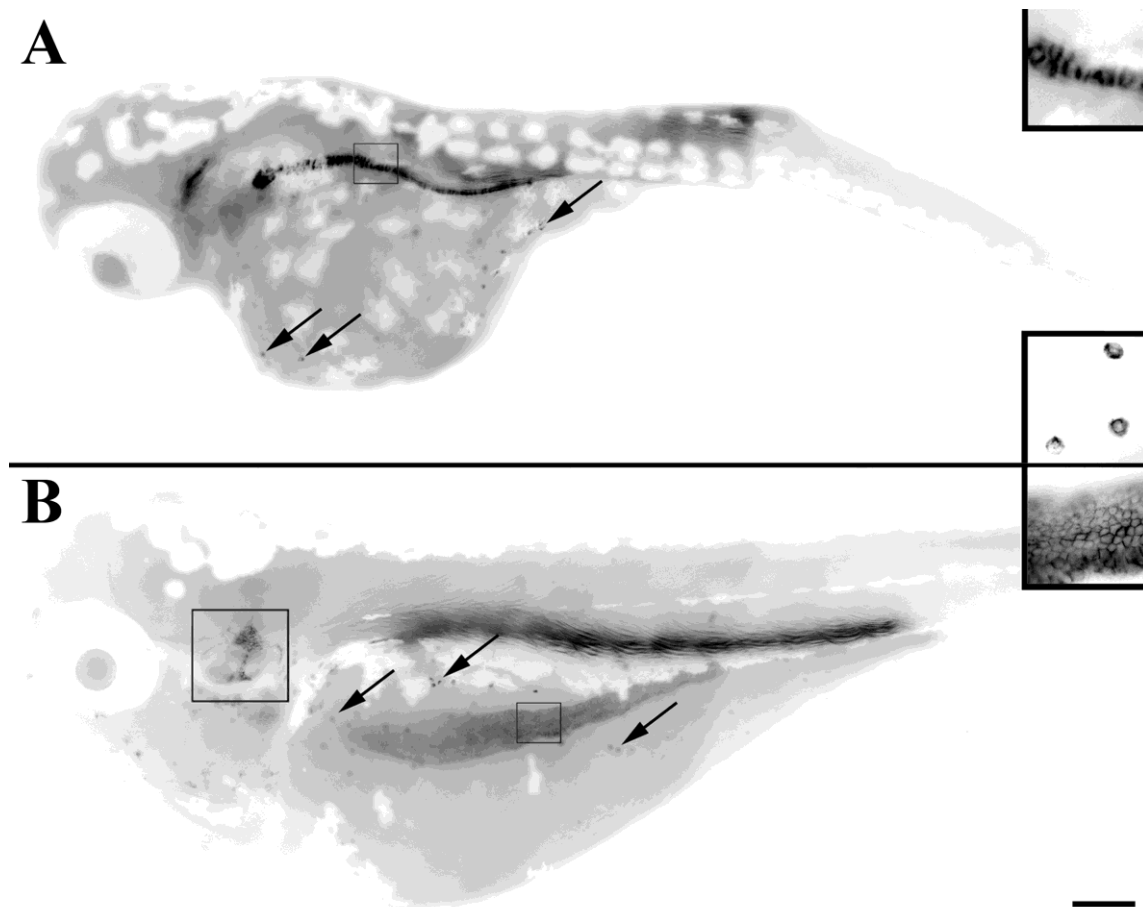


Slika 12. Reprezentativni prikaz lokalizacije $\alpha 1$ podjedinice proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$ (tamno obojenje) u kriopreparatima zebrića razvojnog stadija 96 h fiksiranih 1 h u 4 % PFA u: (A) bazolateralnim membranama epitelnih stanica unutarnjeg uha, (B) bazolateralnim membranama epitelnih stanica u kanalićima pronefrosa i (C) bazolateralnim membranama enterocita srednjeg i stražnjeg dijela crijeva. Veličina mjerila je 100 μm .



Slika 13. Prikaz lokalizacije $\alpha 1$ podjedinice proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$ (tamno obojenje) u kriopreparatima zebrića u: (A-E) pronefrosu svih razvojnih stadija (24 h-120 h), (C-E) crijevu u jedinki 72 h, 96 h i 120 h razvojnih stadija i (F i G) unutarnjem uhu u jedinki 96 h i 120 h razvojnih stadija. Veličina mjerila je 25 μm .

Osim u kriopreparatima, sve lokalizacije $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze bile su vidljive u cjelokupnim ili *whole-mount* uzorcima fiksiranim 24 h Dentovim fiksativom dok u uzorcima koji su bili fiksirani 24 h u 4 % PFA i BT fiksativu nisu bile vidljive lokalizacije $\alpha 1$ podjedinice. Kao i u kriopreparatima, u cjelokupnim uzorcima navedeni je protein lokaliziran u bazolateralnim membranama epitelnih stanica kod jedinki razvojnog stadija 96 h nakon oplodnje: 1) u kanalčićima pronefrosa, 2) u crijevnim enterocitima i 3) u unutarnjem uhu. Cjelokupni uzorci pokazali su i dodatnu lokalizaciju $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze u membranama i citoplazmi stanica bogatih Na^+/K^+ -ATPazom (NKA), odnosno u ionocitima kože (Slika 14). Ova četvrta lokalizacija bila je vidljiva samo u cjelokupnim uzorcima i prvi se puta mogla uočiti kod jedinki razvojnog stadija 72 h nakon oplodnje no nije vidljiva i u kriopreparatima istog razvojnog stadija.



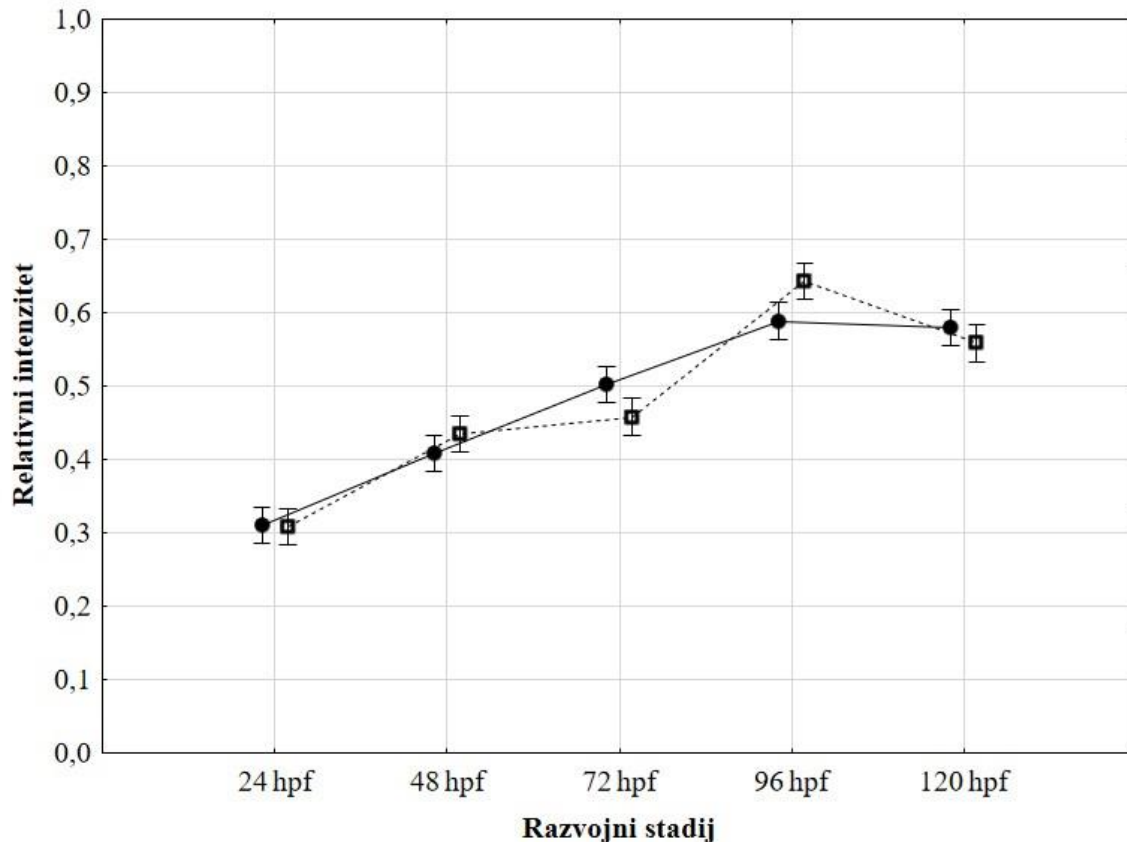
Slika 14. Cjelokupni uzorak zebrice razvojnog stadija 96 h poslije oplodnje fiksirane 24 h Dentovim fiksativom pokazuje lokalizaciju $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze u bazolateralnim membranama epitelnih stanica kanalića pronefrosa (A, pravokutnik na uzorku), u crijevnim enterocitima (B, pravokutnik na uzorku), u unutarnjem uhu (B, veći pravokutnik u predjelu glave) te u koži u prednjem i srednjem dijelu tijela (A i B, označeno strelicama). Veličina mjerila je 150 μm

9.3. Promjene ekspresije $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze

9.3.1. Razvojno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze

Razvojno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze prisutna je u sve tri prethodno navedene lokalizacije. U bazolateralnoj membrani enterocita probavnog trakta $\alpha 1$ podjedinica izražena/vidljiva je tek u jedinki razvojnih stadija 72 h, 96 h i 120 h (Slika 13) dok u ranijim stadijima razvoja nije vidljiva njezina ekspresija. U epitelnim stanicama unutarnjeg uha, ekspresija ovog proteina pojavljuje se u jedinki razvojnih stadija 96 h i 120 h.

Kako je tijekom mikroskopske analize opažena vidljiva promjena signala u bubregu/pronefrosu različitih stadija ribe zebrice, provedeno je mjerenje intenziteta signala u tom organu. Slikovni podaci su obrađeni pomoću ImageJ/Fiji programa te su dobivena mjerenja statistički analizirana Factorial ANOVA analizom ($p < 0,001$) koja je potvrdila statistički značajnu promjenu ekspresije proteina Na^+/K^+ -ATPaze u bazolateralnoj membrani pronefrosa između jedinki razvojnih stadija 24 h – 120 h bez obzira na vrstu korištenog fiksativa za pripremu uzoraka. (Slika 15). Prikazano je značajno povećanje ekspresije ovog transportnog proteina kroz embrionalni razvoj zebrice od 24h do 120 h starosti. Analiza je također pokazala da vrsta fiksativa koji je korišten prilikom pripreme kriopreparata nije značajno utjecao na intenzitet signala $\alpha 1$ podjedinice u različitim stadijima embrionalnog razvoja pronefrosa (Factorial ANOVA, $p > 0,05$).

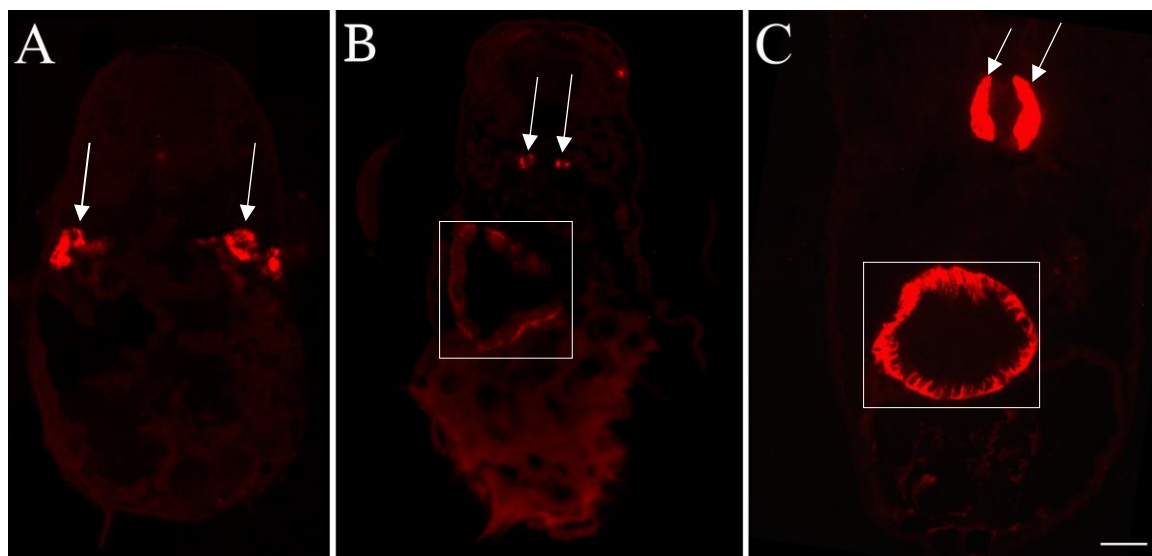


Slika 15. Razvojno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze u kanalici $\acute{\text{m}}$ a pronefrosa ribe zebrice. Factorial ANOVA analiza (Duncan's post hoc test) pokazala je statisti $\acute{\text{c}}$ ki značajnu razliku u intenzitetu $\alpha 1$ podjedinice ovog proteina između razli $\acute{\text{c}}$ itih stadija embrionalnog razvoja riba zebrica fiksiranih s 4 % PFA (isprekidana linija) i BT fiksativom (puna linija) pri čemu je vidljivo postupno povećanje ekspresije $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze neovisno o vrsti korištenog fiksativa.

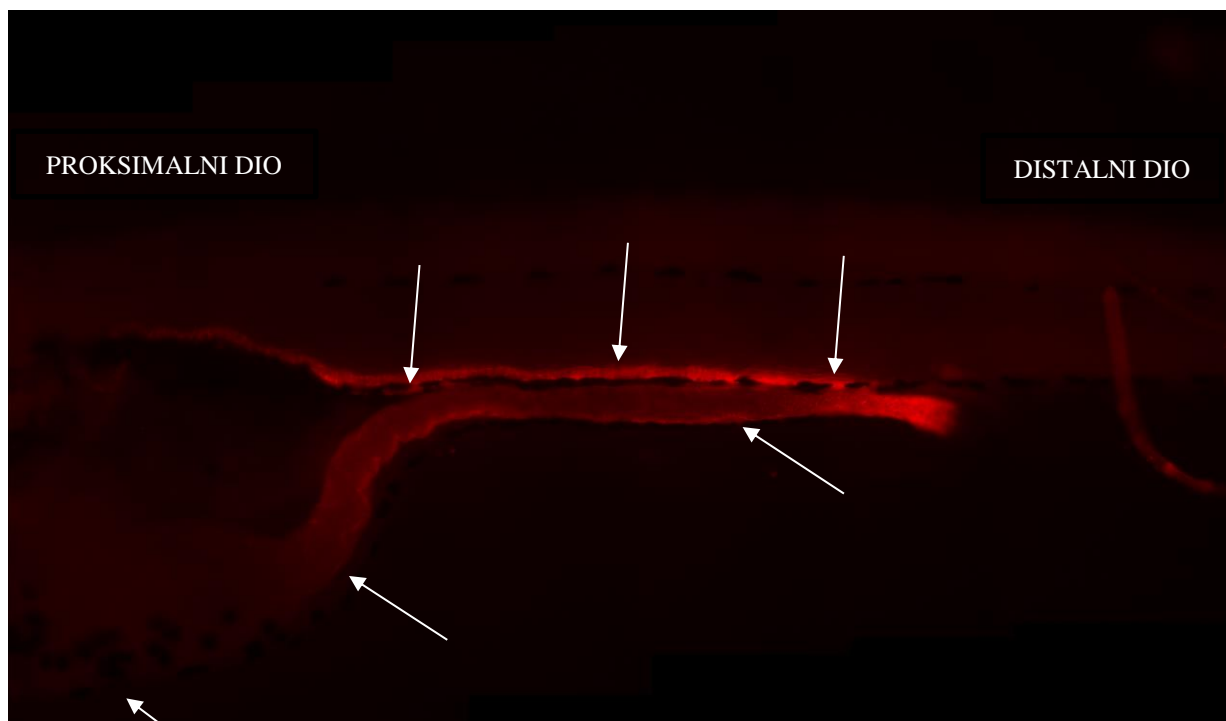
9.3.2. Zonalno-uvjetovana ekspresije $\alpha 1$ podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze

Osim razvojno-uvjetovane ekspresije, u kriopreparatima riba zebrica (Slika 16) i cjelokupnim preparatima (Slika 17) vidljiva je i zonalno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze du $\acute{\text{z}}$ pronefrosa (proksimalni < distalni kanalici) i du $\acute{\text{z}}$ crijeva (anteriorni < srednji \leq posteriorni

dio). Rezultati su pokazali poklapanje zonalno-uvjetovane ekspresije $\alpha 1$ podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze između kriopreparata i cjelokupnih preparata u pronefrosu (Slika 16; proksimalni<distalni kanalići) i crijevu (Slika anterironi<srednji<posterirni dio).

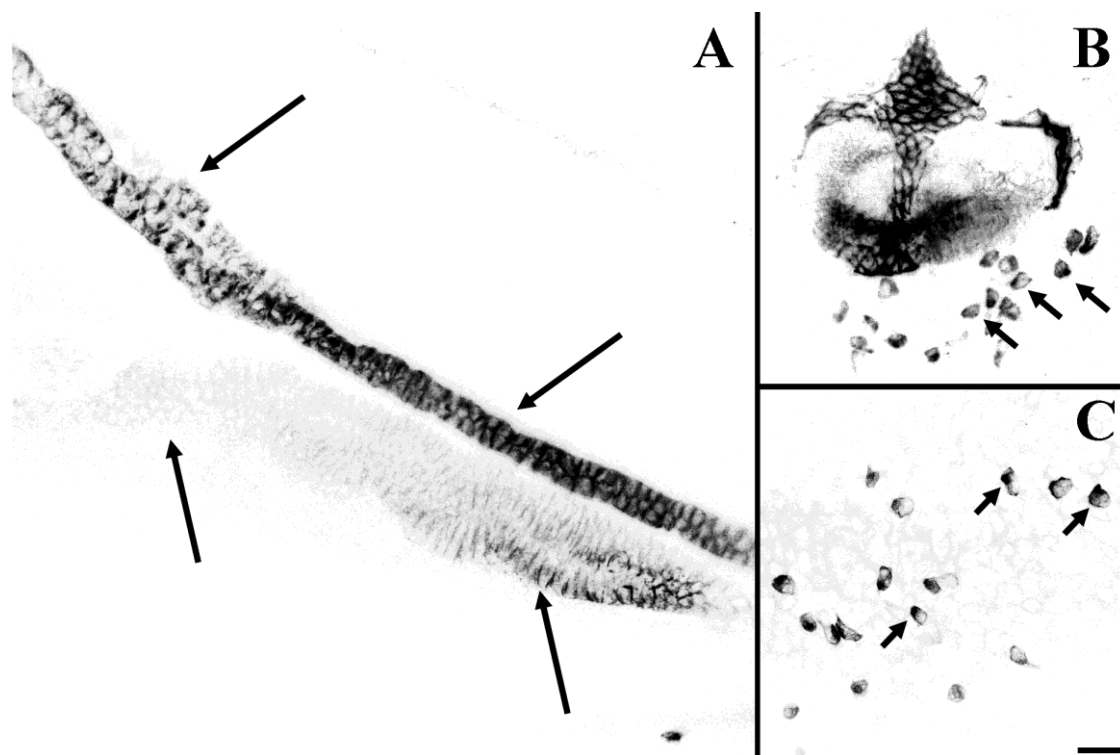


Slika 16. Prikaz zonsko-uvjetovane ekspresije $\alpha 1$ podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze (crveno obojenje) u ribe zebrice razvojnog stadija 96 h nakon oplodnje. Iz prikazanih slika vidljiva je razlika u intenzitetu signala $\alpha 1$ podjedinice između anteriornog, srednjeg i posteriornog dijela bubrega, pri čemu se jači intenzitet signala $\alpha 1$ podjedinice bubrega očituje u posteriornom dijelu (C, označeno strelicama), dok je slabiji intenzitet prisutan u anteriornom i srednjem dijelu prereza (A i B). Također, signal u crijevu jačeg je intenziteta u posteriornom dijelu (C, označeno pravokutnikom) od signala u srednjem dijelu prereza kriopreparata (B, označeno pravokutnikom). Veličina mjerila je 100 μm .



Slika 17. Zonski-uvjetovana lokalizacija i ekspresija $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze u pronefrosu (strelice prema dolje; proksimalni dio < distalni tubuli) i u crijevu (strelice prema gore; proksimalni dio < distalni dio) u cjelokupnom (*whole-mount*) preparatu zebrice stare 96 h nakon oplodnje fiksirane Dentovim fiksativom.

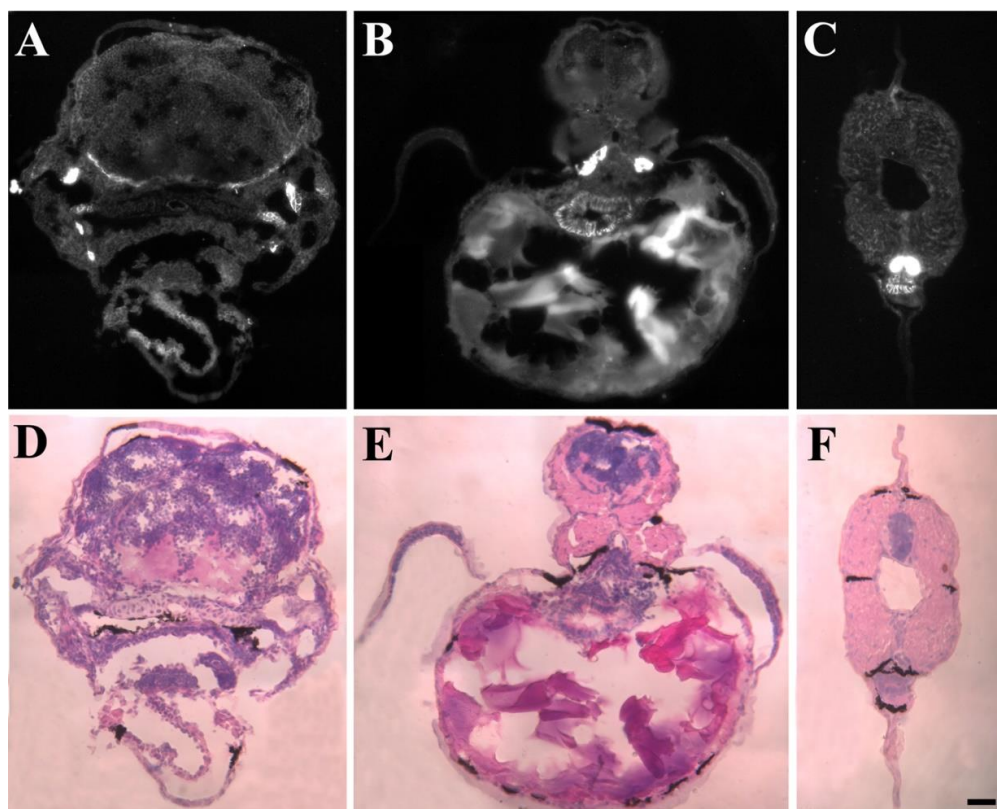
Upotrebom konfokalnog mikroskopa vidljive su sve četiri navedene lokalizacije $\alpha 1$ podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze u cjelokupnim uzorcima (pronefros, crijevo, unutarnje uho i ionociti) i zonalno-uvjetovana ekspresija uzduž pronefrosa i crijeva (Slika 18). Također, veće povećanje na konfokalnem mikroskopu pokazuje da se $\alpha 6\text{F}$ protutijelo nije vezalo samo u membranskim stanicama ionocita već i subapikalno u citoplazmi (Slika 18).



Slika 18. Prikaz detaljne lokalizacije $\alpha 1$ podjedinice proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$ dobiven upotrebom konfokalnog mikroskopa kod zebrice razvojnog stadija 96 h poslije oplodnje fiksirane 24 h Dentovim fiksativom. Vidljiva je zonalno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$ u bazolateralnim membrana epitelnih stanica u kanalićima pronefrosa (A; proksimalni<distalni dio; strelice prema dolje) i u crijevnim enterocitima (A; srednji<posteriorni dio; strelice prema gore). Vidljiva je i lokalizacija ove podjedinice u epitelnim stanicama unutarnjeg uha (B) te u membranama i subapikalno u citoplazmi ionocita bogatih $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPazom}$ koji se nalaze ispod unutarnjeg uha (B; strelice) te u koži prednjeg i srednjeg dijela tijela (C; strelice). Veličina mjerila je 150 μm .

9.4. Kompatibilnost imunofluorescentnog protokola i protokola za histološko bojanje

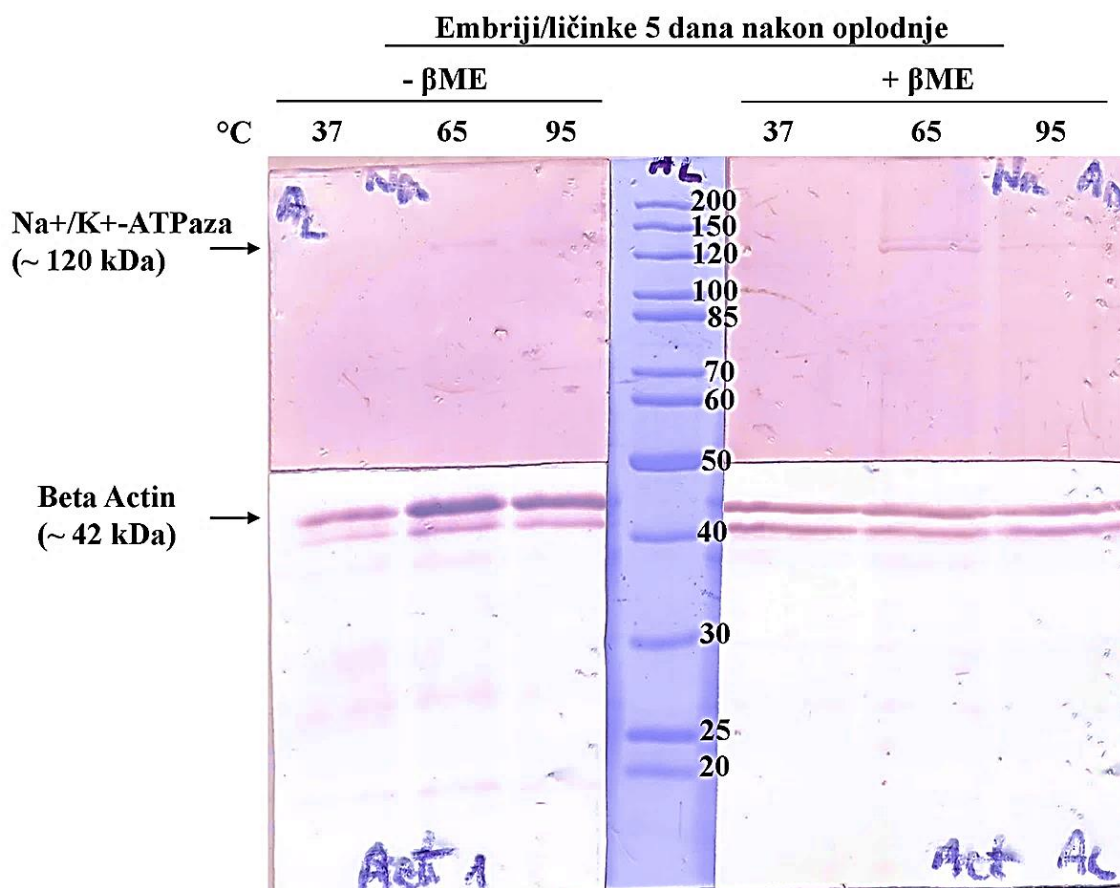
Uspješna obrada uzoraka histološkim bojama hematoksilin i eozin, nakon prethodne obrade 1 % SDS deterdžentom potvrdila je kompatibilnost korištenog protokola za pripremu kriopreparata (Slika 19). Optimalna inkubacija uzoraka u otopinama hematoksilina i eozina starosti mjesec dana iznosila je 25 minuta. Pomoću histološke boje hematoksilina uspješno su obojane jezgre tkiva središnjeg živčanog sustava (siva tvar mozga) i jezgre epitelnih stanica unutarnjeg uha, crijeva, pronefrosa te jezgre hondrocita u hondrokraniju, operkulumu i prsnim perajama ličinka zebrića razvojnog stadija 96 h poslije oplodnje. Obojenje histološkom bojom eozin bilo je vidljivo u bijeloj tvari mozga, citoplazmi skeletnih mišića, koži i vezivnom tkivu. Sadržaj žumanjčane vreće u središtu je obojan eozinom, a vanjski su rubovi obojani hematoksilinom. Obradom uzoraka histološkim bojama nije došlo do fragmentacije i morfoloških promjena tkiva te je sačuvan integritet uzoraka (Slika 19).



Slika 19. Imunofluorescencijska analiza $\alpha 1$ podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze u kombinaciji s histološkim bojanjem hematoksilinom i eozinom kriopreparata zebrića starih 96 h pokazuju lokalizaciju ovog proteina u unutarnjem uhu (A), bubrezima i crijevu (B), i bubrezima u kaudalnom dijelu (C) te bojanje staničnih jezgri (plavo-ljubičasto obojenje hematoksilinom) i citoplazme (ružičasto obojenje eozinom) u rostralnom/anteriornom, srednjem i kaudalnom/posteriornom poprečnom presjeku (D-F). Veličina mjerila je 100 μm .

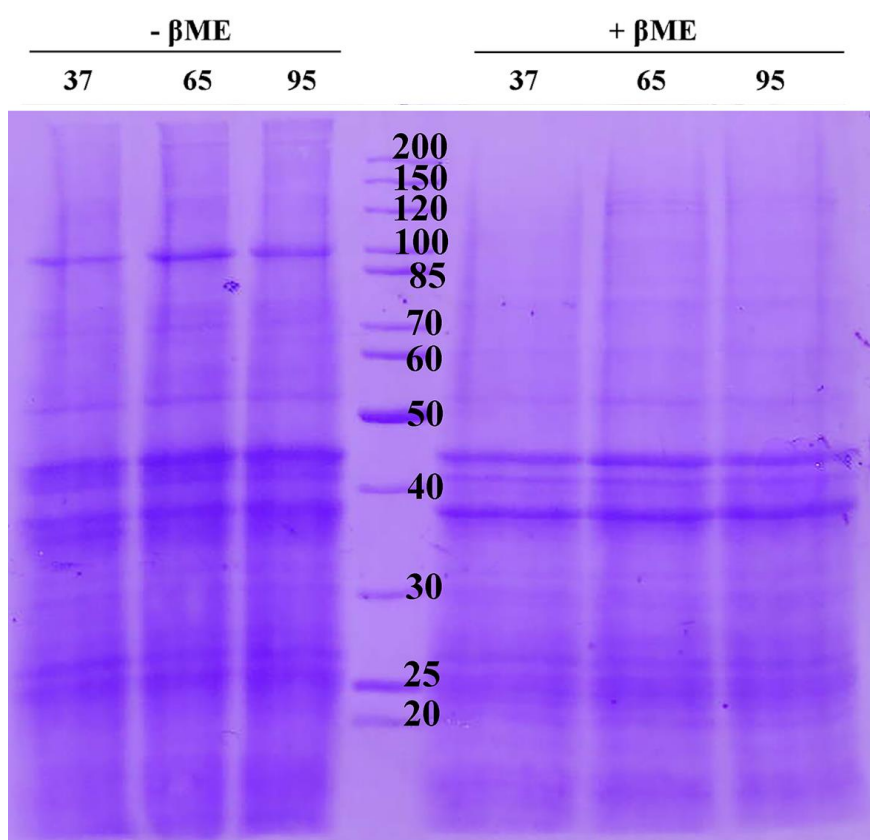
9.5. Western blot

Western blot analiza provedena na homogenatima embrija razvojnog stadija 5 dana nakon oplodnje pomoću primarnog protutijela $\alpha 6\text{F}$ (razrjeđenje 1:100) otkrila je slabu proteinsku prugu molekulske mase ~ 120 kDa. Proteinski signal bio je vidljiv u uzorcima inkubiranim pri $65^\circ\text{C}/15$ min i $95^\circ\text{C}/5$ min uz reducirajuću tvar β -merkaptotanol i u uzorcima inkubiranim na $65^\circ\text{C}/15$ min i $95^\circ\text{C}/5$ min bez β -merkaptotanola (Slika 20). Također, na prikazu transfera proteina vidljiva je relativna količina proteina koja se prenijela iz akrilamidnog gela na PVDF membranu. Naime, iz prikaza je vidljiva relativno manja količina proteina molekulske mase iznad 50 kDa u odnosu na one proteine molekulske mase ispod 50 kDa (Slika 21).



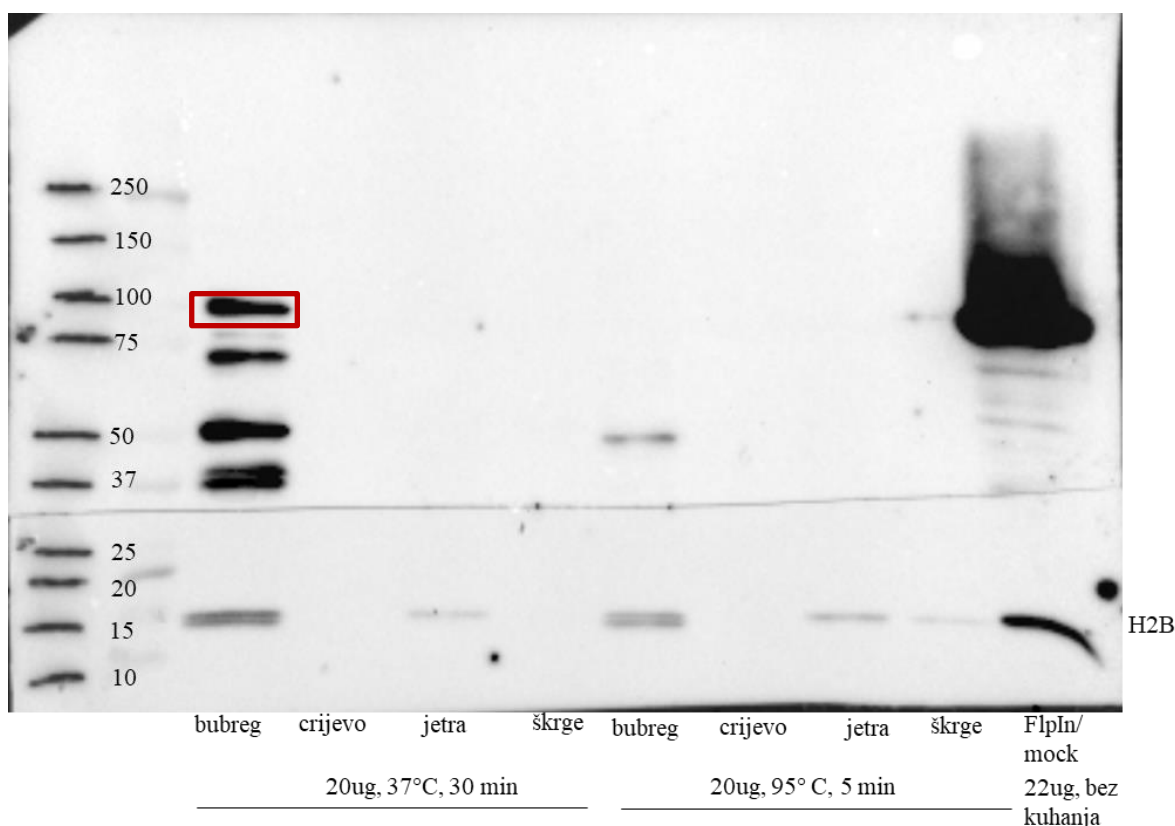
Slika 20. Prikaz proteinske pruge proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u uzorcima embrija razvojnog stadija 5 dana nakon oplodnje inkubiranih pri 65 °C i 95 °C bez β -merkaptetanola i pri 65 °C i 95 C sa β -merkaptetanolom (označeno gornjom strelicom).

Embriji/ličinke 5 dana nakon oplodnje



Slika 21. Prikaz transfera proteina na PVDF membranu uz pomoć Coomassie plave boje na kojoj je vidljiva relativno veća količina proteina molekulskih masa većih od 50 kDa u uzorcima homogenata embrija ribe zebrice koji ne sadrže β -merkaptoetanol.

Analiza PVDF membrane, provedena pomoću kemijske luminiscencije, otkrila je vezanje primarnog protutijela $\alpha 6F$ (razrjeđenje 1:250) u uzorcima bubrega inkubiranih pri 37 °C tijekom 30 min (Slika 23). U uzorcima crijeva, jetre i škrge kuhanih pri 37 °C tijekom 30 min te u uzorcima bubrega, crijeva, jetre i škrge kuhanih pri 95°C 5 min nije došlo do vezanja protutijela, odnosno nisu vidljive proteinske pruge na membrani (Slika 23). Histon H2B protutijelo (~17 kDa) korišteno je kao kontrola nanesenog uzorka stoga nam nedostatak njegovog signala ili slabiji signal ukazuje na raspad uzoraka ili na smanjenu količinu proteina u uzorcima. Pozitivnu je kontrolu predstavljala Flp-In-293/Mock stanična linija.



Slika 23. Vidljiv je jak signal proteinske pruge ~100 kDa (crveni pravokutnik) koji predstavlja vezanje protutijela $\alpha 6F$ za $\alpha 1$ podjedinicu proteina $Na^+/K^+-ATPaze$ u uzorcima bubrega zebreice inkubiranog pri 37 °C tijekom 30 min.

10. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja lokalizacije proteina zebrice primarno su provedena upotrebom vibratomskih presjeka ili na cjelokupnim (*whole-mount*) preparatima, a nešto manje na kriopreparatima (Copper i sur. 2018; Ferguson i Shive 2019; Fischer i sur. 2008). Trenutno za izradu kriopreparata ribe zebrice ne postoji jedinstven i optimalan protokol fiksacije i optimalna metoda otkrivanja antigena koji se mogu koristiti za lokalizaciju/ekspresiju proteina u okviru imuno(histo)kemijskih analiza (Fernández i Fuentes 2013; Inoue i Wittbrodt 2011). Protutijelo $\alpha 6F$ koje je specifično za $\alpha 1$ podjedinicu membranskog proteina $Na^+/K^+-ATPaze$ nije se koristilo u mnogo istraživanja, a niti u jednom od njih nije se koristilo na kriopreparatima (Clemens Grisham i sur. 2013; Drummond i sur. 1998; Zimmer i sur. 2018). Stoga je prvi cilj ovog rada bio odrediti optimalne uvjete pripreme i obrade kriopreparata za optimalnu lokalizaciju $\alpha 1$ podjedinice proteina $Na^+/K^+-ATPaze$. Rezultati ovog istraživanja po prvi put su utvrdili da fiksiranje embrija i ličinki ribe zebrice pomoću PFA i BT fiksativa daje usporediv intenzitet imunohistokemijskog signala i usporedivo očuvanje integriteta uzoraka. Također, naši podaci nisu utvrdili značajne razlike u kvaliteti uzoraka koji su bili inkubirani 1 h ili preko noći u 2,5 % komercijalnoj goveđoj želatini i 25 % saharozu. Debljina presjeka uvelike utječe na kvalitetu uzoraka i efikasnost otopina s kojima kriopresjeci dolaze u reakciju. U dosadašnjim istraživanjima nisu bili korišteni kriopreparati prilikom primjene imunohistokemijskih metoda $\alpha 6F$ protutijelom već cjelokupni ili *whole-mount* preparati (Clemens Grisham i sur. 2013; Drummond i sur. 1998; Zimmer i sur. 2018) i prerezi debljine 3-5 μm (Drummond i sur. 1998). *Whole-mount* preparati ponekad nisu najbolji izbor jer onemogućuju vizualizaciju proteina koji su lokalizirani dublje u tkivu (Ferguson i Shive 2019).

Budući da korištenjem fiksativa često dolazi do maskiranja epitopa što onemogućuje vezanje protutijela za njegovo specifično mjesto potrebno je provesti postupak otkrivanja antigena (Brzica i sur. 2011). Stoga je drugi od ciljeva ovog rada bio otkriti optimalnu metodu koja bi omogućila vezanje protutijela $\alpha 6F$ za svoje specifično vezujuće mjesto dajući pri tome optimalan intenzitet signala. U kriopreparatima epitopi su dostupniji nego u parafinskim preparatima te ih nije potrebno tretirati grubim protokolima koji uključuju alkohole i zagrijavanje na visokim temperaturama već je dovoljna obrada deterđentima (Brzica i sur. 2011). Istraživanje Brzice i sur.

2011, pokazalo je obradu deterdžentom SDS kao optimalnu metodu otkrivanja epitopa u kriopreparatima bubrega štakora. Prilikom obrade uzoraka u različitim uvjetima, prema protokolima preuzetih od Brzica i sur. 2011, kao optimalna metoda otkrivanja epitopa u kriopreparatima zebrice pokazala se obrada deterdžentom SDS (1 %) kojom je sačuvan integritet uzoraka i oštećenja tkiva bila su minimalna.

Do sada je navedenim protutijelom a6F dokazana samo lokalizacija $\alpha 1$ podjedinice proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u pronefrosu zebrice (Drummond i sur. 1998), u unutarnjem uhu (Clemens Grisham i sur. 2013) i u Na⁺/K⁺-ATPazom bogatim stanicama (NKA stanice) (Zimmer i sur. 2018) dok je lokalizacije α podjedinice u crijevu detektirane a5 protutijelom (Levic i sur. 2020). U ovom je radu pomoću optimalno pripremljenih kriopreparata, imunofluorescencijskom analizom uspješno lokalizirana $\alpha 1$ podjedinica membranskog proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u bazolateralnim membranama epitelnih stanica pronefrosa (24 h – 120 h), crijevu (72 h – 120 h) i unutarnjem uhu (96 h – 120 h). Dakle, optimalna priprema kriopreparata u kombinaciji s odgovarajućim fiksativom i optimalnom metodom otkrivanja antigena omogućila je vezanje a6F u pronefrosu i u unutarnjem uhu i po prvi puta u crijevu ribe zebrice.

Nadalje, utvrđena je razvojno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice u bazolateralnim membranama pronefrosa zebrice koja značajno raste od 24 h do 120 h nakon oplodnje neovisno o vrsti korištenog fiksativa (PFA i BT fiksativ). Navedeni nalaz u ovom radu slijedi razvojno-uvjetovanu ekspresiju mRNA *atplala.1* i *atplala.4* tandem ponavljajućih gena koji pokazuju najveću ekspresiju u pronefrosu i unutarnjem uhu već u stadiju 15 somita te pokazuju isti trend razvojno-uvjetovane ekspresije (Abbas i Whitfield 2009; Blasiolo i sur. 2002). Osim u pronefrosu, rezultati ovog istraživanja pokazali su postojanje razvojno-uvjetovane ekspresije ove podjedinice i u crijevu i unutarnjem uhu iako ista nije kvantificirana. U crijevu je signal vidljiv tek kod 72 h starih jedinki, što je moguće zato što se u periodu između 34 h-120 h crijevo najviše razvija i epitelne stanice najviše rastu (Wallace i sur. 2005). Rezultati istraživanja pokazuju vidljiv signal u unutarnjem uhu tek kod jedinki razvojnog stadija 96 h i 120 h nakon oplodnje što se poklapa s razvojem unutarnjeg uha, koje postaje funkcionalno tek nakon 72 h od oplodnje, te se ovaj rezultat poklapa s *in situ* hibridizacijskim profilom ekspresije mRNA gena $\alpha 1$ podjedinice (Abbas i

Whitfield 2009; Whitfield i sur. 2002). Zanimljivo je da je starosno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice proteina Na⁺/K⁺-ATPaze drugačija u unutarnjem uhu i crijevu s obzirom na to radi li se o kriopreparatima ili *whole-mount* preparatima. Ta je razlika moguće posljedica korištenja različitih fiksativa (4 % PFA za kriopreparate i Dentov fiksativ za *whole-mount* preparate) i različitih metoda otkrivanja epitopa (obrada deterdžentom SDS kriopreparata i obrada otopinom PBSt *whole-mount* preparata). Različiti fiksativi i različite metode otkrivanja epitopa mogu uzrokovati razlike u vezanju protutijela u tkivima (Brzica i sur. 2011). Ali, tip uzorka (kriopreparati, *whole-mount* preparati), određuju odabir fiksativa i metode otkrivanja epitopa (Brzica i sur. 2011; Ferguson i Shive 2019; Inoue i sur. 2012). Stoga je važno, u istraživanjima, koristiti više tipova uzoraka jer se korištenjem samo jednog načina možda ne bi vidjele sve moguće lokalizacije proteina kao što je opisano u ovom radu gdje je signal u ionocitima bio vidljiv u *whole-mount* prepratima, ali ne i u kriopreparatima zebrice.

Osim razvojno-uvjetovane ekspresije, ovo je istraživanje pokazalo i zonalno-uvjetovanu ekspresiju $\alpha 1$ podjedinice proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u pronefrosu i crijevu ribe zebrice s povećanjem intenziteta signala od proksimalnog prema distalnom dijelu tih organa. Ovakva, zonalno-uvjetovana ekspresija, vjerojatno je prisutna zbog najveće prisutnosti ionskih transportera upravo u dijelovima najvećeg intenziteta signala (Gerlach i Wingert 2013; Wallace i sur. 2005). Intenzivni signal u pronefrosu $\alpha 1$ podjedinice poklapa se s njegovom osmoregulatornom funkcijom koja omogućuje normalnu ionsku homeostazu riba u kopnenim vodama (Drummond i sur. 1998). Anteriorni dio crijeva proširen je te služi kao rezervoar za hranjive tvari, dok su transporteri u enterocitima izraženi u srednjem i stražnjem dijelu crijeva (Wallace i sur. 2005) stoga je tamo intenzitet signala proteina Na⁺/K⁺-ATPaze puno jači. Dakle navedeni rezultati ovog istraživanja uz već poznatu tkivno-specifičnu po prvi put otkrivaju razvojno- i zonalno-uvjetovanu ekspresiju $\alpha 1$ podjedinice membranskog proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u kriopreparatima ribe zebrice.

Također, kriopreparati su uspješno korišteni za histološko bojanje hematoksilinom i eozinom bez narušavanja strukturnog integriteta tkiva što pokazuje kvalitetu i višestruku korisnost kriopreparata te kompatibilnost imunohistokemijskog protokola (obrada deterdžentom SDS) s protokolom za histološko bojanje. Njihova kompatibilnost i upotreba krioprereza omogućavaju

detaljnu analizu lokalizacije proteina koji se nalaze duboko u tkivima koje ne bi bilo moguće lokalizirati pomoću *whole-mount* preparata (Ferguson i Shive 2019).

Također, protutijelo $\alpha 6F$ može se koristiti i za detekciju proteina Na^+/K^+ -ATPaze Western blot metodom pri čemu je ovaj protein detektiran na veličini ~ 110 kDa u uzorcima 5 dana starih embrija i u uzorcima bubrega odrasle zebrice. Do sada je ovo protutijelo korišteno isključivo za imunohistokemijske metode na uzorcima zebrice (Clemens Grisham i sur. 2013; Drummond i sur. 1998; Zimmer i sur. 2018) stoga je ovo prvi slučaj imunokemijske karakterizacije $\alpha 6F$ protutijela Western blot analizom.

Ovo je istraživanje po prvi put prikazalo prisutnost $\alpha 1$ podjedinice proteina Na^+/K^+ -ATPaze $\alpha 6F$ protutijelom u crijevu zebrice, starosno- i zonalno-uvjetovanu ekspresiju, te prvu imunokemijsku analizu Western blot metodom upotrebom navedenog protutijela u embrijama i bubregu ribe zebrice. Također, ovim je radom opisana optimalna metoda otkrivanja epitopa zajedno s optimalnim odabirom fiksativa i razrjeđenja $\alpha 6F$ protutijela što će omogućiti njegovo daljnje korištenje u istraživanjima. Osim toga, ovakva optimizirana metoda poslužit će za daljnje imunokemijske analize drugih protutijela, koja su danas sve dostupnija za korištenje na uzorcima zebrice.

11. Zaključak

Ovim je istraživanjem, imunofluorescencijskom analizom, određena optimalna vrsta fiksativa zajedno s optimalnom metodom otkrivanja antigena u kriopreparatima ribe zebrice za detekciju $\alpha 1$ podjedinica membranskog proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$. Također, utvrđeno je optimalno razrjeđenje a6F komercijalno dostupnog protutijela kojim je lokalizirana i utvrđena tkivno-specifična te razvojno- i zonalno-uvjetovana ekspresija $\alpha 1$ podjedinice membranskog proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$. S obzirom na nedostatak istraživanja provedenih na kriopreparatima navedenog modelnog organizma, ovaj optimizirani protokol omogućit će lakše i efikasnije testiranje različitih protutijela. Osim toga, utvrđena kompatibilnost imunohistokemijskog protokola i protokola za histološko bojanje dokazuje mogućnost višestrukog korištenja istih kriopreparata u različitim analizama. Konačno, imunohistokemijske analize kriopreparata danas su vrlo korisne za karakterizaciju različitih fenotipova mutanata koji se sve više koriste kao modeli ljudskih bolesti u biomedicinskim istraživanjima. Ovakav optimizirani protokol, omogućuje daljnja istraživanja lokalizacije i funkcije proteina $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaze}$ u embrijima i odraslim jedinkama ribe zebrice. S obzirom da su danas sve dostupnija protutijela koja se mogu koristiti na tkivima zebrice, ovakvi optimizirani protokoli izrade kriopreparata i optimizirane metode otkrivanja epitopa veoma su važni za buduća kvalitetna i pouzdana testiranja protutijela.

12. Literatura

- Abbas L., Whitfield T.T. (2009): Nkcc1 (Slc12a2) is required for the regulation of endolymph volume in the otic vesicle and swim bladder volume in the zebrafish larva. *Development* **136**: 2837–2848.
- Alshammari M.A., Alshammari T.K., Laezza F. (2016): Improved methods for fluorescence microscopy detection of macromolecules at the axon initial segment. *Front. Cell. Neurosci.* **10**: 1–20.
- Bambino K., Chu J. (Elsevier Inc.: 2017). *Zebrafish in Toxicology and Environmental Health*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **124**: .
- Barthel, L. K., Raymond P.A. (1991): Improved method for obtaining 3- μ m cryosections for immunocytochemistry [2]. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 549.
- Blasiolo B., Canfield V., Degraeve A., Thisse C., Thisse B., Rajarao J., Levenson R. (2002): Cloning, mapping, and developmental expression of a sixth zebrafish Na,K-ATPase α 1 subunit gene (atp1a1a.5). *Mech. Dev.* **119**: 211–214.
- Blasiolo B., Canfield V.A., Vollrath M.A., Huss D., Mohideen M.A.P.K., Dickman J.D., Cheng K.C., Fekete D.M., Levenson R. (2006): Separate Na,K-ATPase genes are required for otolith formation and semicircular canal development in zebrafish. *Dev. Biol.* **294**: 148–160.
- Braunbeck T., Lammer E. (2006): Fish embryo toxicity assays. *Contract* **20**: 725–731.
- Brzica H., Breljak D., Vrhovac I., Sabolic I. (2011): Role of microwave heating in antigen retrieval in cryosections of the formalin-fixed mammalian tissues. *Microw. Heat.* doi:10.5772/20319.
- Canfield V.A., Loppin B., Thisse B., Thisse C., Postlethwait J.H., Mohideen M.A.P.K., Rajarao S.J.R., Levenson R. (2002): Na,K-ATPase α and β subunit genes exhibit unique expression patterns during zebrafish embryogenesis. *Mech. Dev.* **116**: 51–59.
- Carpio Y. (2006): Zebrafish as a Genetic model organism. .
- Clausen M. V., Hilbers F., Poulsen H. (2017): The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Front. Physiol.* **8**: 1–16.
- Clemens Grisham R., Kindt K., Finger-Baier K., Schmid B., Nicolson T. (2013): Mutations in

ap1b1 Cause Mistargeting of the Na⁺/K⁺-ATPase Pump in Sensory Hair Cells. PLoS One **8**:

- Copper J.E., Budgeon L.R., Foutz C.A., Rossum D.B. van, Vanselow D.J., Hubley M.J., Clark D.P., Mandrell D.T., Cheng K.C. (2018): Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* **208**: 38–46.
- Dawid I.B. (2004): Developmental biology of zebrafish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1038**: 88–93.
- Dooley K., Zon L.I. (2000): Zebrafish: A model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**: 252–256.
- Drummond I.A., Davidson A.J. (Elsevier Ltd: 2016). *Zebrafish kidney development*. *Methods Cell Biol.* **134**: .
- Drummond I.A., Majumdar A., Hentschel H., Elger M., Solnica-Krezel L., Schier A.F., Neuhauss S.C.F., Stemple D.L., Zwartkuis F., Rangini Z., Driever W., Fishman M.C. (1998): Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* **125**: 4655–4667.
- Embryology C., Embryology E., Embryology M., Frog T., Cycle L., Patterns D., Biology E.D., Adhesion C. (2007): PART 1 . *Principles of development in biology*. .
- Ferguson J.L., Shive H.R. (2019): Sequential immunofluorescence and immunohistochemistry on cryosectioned zebrafish embryos. *J. Vis. Exp.* **2019**: 1–8.
- Fernández J., Fuentes R. (2013): Fixation/Permeabilization: New alternative procedure for immunofluorescence and mrna in situ hybridization of vertebrate and invertebrate embryos. *Dev. Dyn.* **242**: 503–517.
- Fischer A.H., Jacobson K.A., Rose J., Zeller R. (2008): Cryosectioning tissues. *Cold Spring Harb. Protoc.* **3**: 8–10.
- 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. *Cell. Microbiol.* **22**: .
- Gerlach G.F., Wingert R.A. (2013): Kidney organogenesis in the zebrafish: insights into vertebrate nephrogenesis and regeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**: 559–585.

- Guh Y.J., Lin C.H., Hwang P.P. (2015): Osmoregulation in zebrafish: Ion transport mechanisms and functional regulation. *EXCLI J.* **14**: 627–659.
- Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* **86**: 6–19.
- Hwang P.P., Chou M.Y. (2013): Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **465**: 1233–1247.
- Inoue B.H., Santos L. dos, Pessoa T.D., Antonio E.L., Pacheco B.P.M., Savignano F.A., Carraro-Lacroix L.R., Tucci P.J.F., Malnic G., Girardi A.C.C. (2012): Increased NHE3 abundance and transport activity in renal proximal tubule of rats with heart failure. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **302**: 166–175.
- Inoue D., Wittbrodt J. (2011): One for all-a highly efficient and versatile method for fluorescent immunostaining in fish embryos. *PLoS One* **6**: 1–7.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253–310.
- Levic D.S., Ryan S., Marjoram L., Honeycutt J., Bagwell J., Bagnat M. (2020): Distinct roles for luminal acidification in apical protein sorting and trafficking in zebrafish. *J. Cell Biol.* **219**: .
- Liao B.K., Chen R.D., Hwang P.P. (2009): Expression regulation of Na⁺-K⁺-ATPase α 1-subunit subtypes in zebrafish gill ionocytes. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**: 1897–1906.
- Link B.A., Megason S.G. (2008): Zebrafish as a model for development. *Source B. Model. Biomed. Res.* 103–112doi:10.1007/978-1-59745-285-4_13.
- Liu C., Gu S., Sun C., Ye W., Song Z., Zhang Y., Chen Y.P. (2013): FGF signaling sustains the odontogenic fate of dental mesenchyme by suppressing β -catenin signaling. *Dev.* **140**: 4375–4385.
- Macdonald R. (1999): Zebrafish immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol.* **127**: 77–88.
- Menke A.L., Spitsbergen J.M., Wolterbeek A.P.M., Woutersen R.A. (2011): Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol. Pathol.* **39**: 759–775.
- Moldoveanu S.C., David V. (2013). *Basic Information about HPLC*. Essentials Mod. HPLC Sep.

doi:10.1016/b978-0-12-385013-3.00001-x.

- Pivovarov A.S., Calahorro F., Walker R.J. (2019): Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invertebr. Neurosci.* **19**: 1–16.
- Rajarao S.J.R., Canfield V.A., Mohideen M.A.P.K., Yan Y.L., Postlethwait J.H., Cheng K.C., Levenson R. (2001): The repertoire of Na, K-ATPase α and β subunit genes expressed in the Zebrafish, *Danio rerio*. *Genome Res.* **11**: 1211–1220.
- Roper C., Tanguay R.L. (Elsevier Inc.: 2018). *Zebrafish as a model for developmental biology and toxicology*. Handb. Dev. Neurotoxicology doi:10.1016/B978-0-12-809405-1.00012-2.
- Rost F. (Elsevier Ltd.: 2016). *Fluorescence microscopy, applications*. *Encycl. Spectrosc. Spectrom.* doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00147-3.
- Teame T., Zhang Z., Ran C., Zhang H., Yang Y., Ding Q., Xie M., Gao C., Ye Y., Duan M., Zhou Z. (2019): The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Anim. Front.* **9**: 68–77.
- VELDMAN M.B., Lin S. (2008): Zebrafish as a Developmental Model Organism for. *Pediatr. Res.* **64**: 470–476.
- Wallace K.N., Akhter S., Smith E.M., Lorent K., Pack M. (2005): Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech. Dev.* **122**: 157–173.
- Webb S.E., Miller A.L. (2007): Ca²⁺ signalling and early embryonic patterning during zebrafish development. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**: 897–904.
- White R.J., Collins J.E., Sealy I.M., Wali N., Dooley C.M., Digby Z., Stemple D.L., Murphy D.N., Billis K., Hourlier T., Füllgrabe A., Davis M.P., Enright A.J., Busch-Nentwich E.M. (2017): A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *Elife* **6**: 1–32.
- Whitfield T.T., Riley B.B., Chiang M.Y., Phillips B. (2002): Development of the zebrafish inner ear. *Dev. Dyn.* **223**: 427–458.
- Zimmer A.M., Dymowska A.K., Kumai Y., Goss G.G., Perry S.F., Kwong R.W.M. (2018): Assessing the role of the acid-sensing ion channel ASIC4b in sodium uptake by larval zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* **226**: 1–10.

12. Životopis

Arvena Bošnjak rođena je 1. svibnja 1998. godine u Zagrebu, Republika Hrvatska. Osnovnoškolsko obrazovanje stekla je u Osnovnoj školi Ante Kovačića, a srednjoškolsko u II. gimnaziji u Zagrebu. Završila je preddiplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu tijekom kojeg je sudjelovala na događanjima Dan i noći PMF-a i Smotri sveučilišta. Upisala je 2020. diplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu tijekom kojeg je odradila Stručnu praksu na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, dobitnica je Rektorove nagrade te je sudjelovala na 4. Simpoziju o invazivnim vrstama i na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja kao aktivni izlagač.