

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena D. Petrović

**Uloge signalnih puteva kinaze
regulisane ekstracelularnim signalima,
proteinskih kinaza PKB i PKC u razvoju i
ekspresiji gena embriona ribe zebrice**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena D. Petrović

**The roles of extracellular signal-
regulated kinases, protein kinases PKB
and PKC in development and gene
expression of zebrafish embryos**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI:

dr Nebojša Andrić, docent
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

dr Gordana Matić, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA:

dr Radmila Kovačević, profesor emeritus
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Kristina Pogrmić-Majkić, viši naučni saradnik
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane.....

**SPISAK RADOVA U KOJIMA SU PRIKAZANI REZULTATI
DOKTORSKE DISERTACIJE**

1. Hrubik J., Glišić B., Samardžija D., Stanić B., Pogrmić-Majkić K., Fa S., Andrić N. (2016): Effect of PMA-induced protein kinase C activation on development and apoptosis in early zebrafish embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*; 190:24-31; doi: [10.1016/j.cbpc.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.08.002)

2. Hrubik J., Glišić B., Fa S., Pogrmić-Majkić K., Andrić N. (2016): Erk-Creb pathway suppresses glutathione-S-transferase pi expression under basal and oxidative stress conditions in zebrafish embryos. *Toxicology Letters*, 240(1):81-92;
doi: [10.1016/j.toxlet.2015.10.013](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.013)

Veliko hvala dugujem profesorici dr Radmili Kovačević, koja mi je otvorila vrata fiziologije životinja još tokom osnovnih studija i koja me je naučila šta je rad u laboratoriji i u timu.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Nebojši Andriću, koji je prihvatio da zapliva sa mnom u, nama tada, nepoznati svet ribe zebrice, koji je uspeo da na kraju svake slepe ulice napravi raskršće. Hvala na poverenju i razumevanju, savetima i podršci na svakom koraku tokom ovog puta.

Hvala kolegi i prijatelju Branki, zebrafish saborcu i aktivnom članu trilogije visokog obrazovanja.

Veliko hvala prof. dr Gordani Matić, čija spremnost da izađe u susret svakom zahtevu i razumevanje za svaki problem su neprocenjivi.

Hvala članovima komisije prof. dr Dušanki Savić-Pavićević i dr Kristini Pogrmić-Majkić na savetima i sugestijama pri izradi disertacije.

Puno hvala mojim kolegama i prijateljima, bivšim i sadašnjim članovima nekadašnje LECOTOX i RES grupe. Sa njima je ceo ovaj put bio lakši, bez njih ne bi bilo moguće doći do kucanja ovih stranica. Hvala Šandoru na tehničkoj i logističkoj podršci u gajilištu. Hvala svim drugim kolegama sa Departmana koji su bili tu u momentima kad je to trebalo.

Hvala kolegamicama iz SP laboratorije na razumevanju i podršci tokom samog finala izrade ove disertacije.

Hvala prijateljima koji su izdržali do kraja da to i ostanu.

Najveće hvala mojim najmilijima. Od nekih me razdvajaju pogledi, od nekih manje ili više kilometara, od nekih okeani, a od nekih univerzumi.

Ovu disertaciju posvećujem mami i tati.

Uloge signalnih puteva kinaze regulisane ekstracelularnim signalima, proteinskih kinaza PKB i PKC u razvoju i ekspresiji gena embriona ribe zebrice

SAŽETAK

Uticaj ekstraćelijskim signalima regulisanih kinaza (ERK), proteinskih kinaza B (PKB; AKT) i proteinskih kinaza C (PKC) na adultne ćelija su dobro proučeni ali postoji relativno malo podataka o njihovim efektima tokom embriogeneze. U cilju definisanja uloga Erk, Akt i Pkc signalizacije tokom rane embriogeneze, embrioni riba zebrica su tretirani farmakološkim inhibitorima i stimulatorima ovih signalnih puteva. Rezultati su pokazali da Erk inhibiše ekspimiranje gena za glutation *S*-transferazu *Pi* (*gstp1-2*) i citohrom P450 1a (*cyp1a*) koji učestvuju u metabolizmu ksenobiotika i održavanju redoks ravnoteže tokom rane embriogeneze. Inhibitorni efekat Erk na ekspimiranje *gstp1-2* se ostvaruje preko aktivacije transkripcionog faktora Creb (engl. *cAMP response element-binding protein*). Tokom oksidativnog stresa izazvanog *tert*-butilhidrokinonom (tBHQ), nije došlo do aktivacije Erk, te je i izostao efekat ove kinaze na tBHQ zavisnu indukciju ekspimiranja *gstp1-2*. Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) je doveo do povećanja fosforilacije Erk, ali nije menjao ekspimiranje *gstp1-2*. Inhibicija aktivnosti kinaza Erk sa U0126 je omogućila ekspimiranje *gstp1-2* kod embriona tretiranih sa PMA. Globalna aktivacija Pkc izazvana delovanjem PMA je dovela do pojave razvojnih deformiteta, smanjenja stope preživljavanja, pojave apoptotičnih ćelija u regionu mozga, povećanja ekspimiranja proapoptotičnih gena *casp9* (*kaspaza 9*) i *puma* (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) i gena za antioksidativne enzime superoksid dismutazu 2 (*Sod2*) i katalazu (*Cat*) kod embriona riba zebrica. Inhibicija Pkc je poboljšala stopu preživljavanja, smanjila apoptozu u mozgu i smanjila ekspimiranje *casp9* i *puma* u embrionima izloženim PMA, ali nije sprečila pojavu deformacija niti oksidativni stres. Rezultati u ovoj disertaciji ukazuju da Erk deluje inhibitorno na ekspimiranje gena *gstp1-2* i *cyp1a* u neometanim uslovima razvoja embriona, dok aktivacija ove kinaze sprečava povećanje *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa. Prekomerna aktivacija Pkc tokom rane embriogeneze zebrica dovodi do apoptoze i smanjene stope preživljavanja embriona riba zebrica.

Ključne reči: embrioni riba zebrica, Erk, Pi3k/Akt, Pkc, Gstp1-2, apoptoza, tBHQ, PMA

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija, Fiziologija

The roles of extracellular signal-regulated kinases, protein kinases PKB and PKC in development and gene expression of zebrafish embryos

ABSTRACT

Extracellular signal regulated kinase (ERK), protein kinase B (PKB, i.e. AKT) and protein kinase C (PKC) signaling pathways and their impact on the adult cell functions are well studied, but only few data exist regarding their role during embryogenesis. In order to reveal the role of these signaling pathways during early embryogenesis, zebrafish embryos were treated with inhibitors or activators of the above mentioned signaling pathways. The results showed that Erk inhibited transcription of glutathione S-transferase *Pi* (*gstp1-2*) and cytochrome P450 1a (*cyp1a*) genes, which are involved in metabolism of xenobiotics and redox regulation in embryos. The inhibitory effect of Erk is transmitted through the Creb (cAMP response element-binding protein) transcription factor. During oxidative stress provoked by *tert*-butylhydroquinone (tBHQ), the Erk activity was not enhanced and therefore it failed to prevent the stimulatory effect of tBHQ on *gstp1-2* gene expression. On the other hand, inhibition of the Erk activity by U0126 allowed phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) to induce *gstp1-2* during oxidative stress. Addition of PMA caused various developmental deformities, decreased survival rate, increased the number of apoptotic cells in the brain region, and enhanced the expression of proapoptotic *casp9* (Caspase 9) and *puma* (p53 upregulated modulator of apoptosis, *puma*) and antioxidative *sod2* (superoxide dismutase 2) and *cat* (catalase) genes in zebrafish embryos. The inhibition of Pkc by pharmacological inhibitor improved overall survival rate, reduced apoptosis in the brain and decreased expression of *casp9* and *puma* in the PMA-exposed embryos, but did not prevent deformities and oxidative stress. These data suggest that Erk inhibits *gstp1-2* and *cyp1a* during normal embryogenesis. The activation of Erk during oxidative stress can also prevent the expression of *gstp1-2*. Direct over-activation of Pkc during early embryogenesis of zebrafish is associated with apoptosis and decreased survival rate of the embryos.

Key words: zebrafish embryos, Erk, Pi3k/Akt, Pkc, Gstp1-2, apoptosis, tBHQ, PMA

Research area: Biology

Area of special interest: Molecular biology, Physiology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Embrioni riba zebrica	2
1.2. Signalni putevi.....	6
1.2.1. Erk.....	6
1.2.2. Pi3k/Akt	8
1.2.3. Pkc.....	9
1.3. I i II faza metabolizma ksenobiotika	12
1.3.1. Enzimi Cyp	13
1.3.1.1. Cyp1a	13
1.3.1.2. Cyp3a65	14
1.3.2. Enzimi Gst.....	14
1.3.2.1. Gst <i>Alpha</i>	15
1.3.2.2. Gst <i>Mu</i>	16
1.3.2.3. Gst <i>Pi</i>	16
1.3.2.4. Regulacija ekspimiranja Gst.....	17
1.4. Antioksidativni enzimi	19
1.4.1. Hem oksigenaza	19
1.4.2. Superoksid dismutaza	20
1.4.3. Katalaza.....	20
1.4.4. Glutation peroksidaza	21
1.5. Apoptoza.....	21
1.6. Razvoj nervnog sistema.....	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28

3. MATERIJAL I METODE	31
3.1. Hemikalije	32
3.2. Model organizam – embrioni ribe zebrice	34
3.2.1. Gajilište	34
3.2.2. Embrioni ribe zebrice	34
3.2.3. Parenje zebrica i selekcija oplodjenih embriona	35
3.3. Tretmani	36
3.4. Eksperimentalni dizajn 1	37
3.5. Eksperimentalni dizajn 2	38
3.6. Eksperimentalni dizajn 3	39
3.7. Analiza eksprimiranja gena	40
3.7.1. Izolacija totalne RNK i reverzna transkripcija	40
3.7.2. Relativna kvantifikacija eksprimiranja gena	41
3.7.3. Analiza transkripata <i>gstp1</i> i <i>gstp2</i> metodom PCR	44
3.8. Analiza proteina	44
3.8.1. Određivanje ukupne količine proteina u uzorcima	44
3.8.2. SDS-PAGE i Western blot analiza	45
3.9. Analiza promotora	46
3.10. Analiza morfologije embriona riba zebrica	47
3.11. Analiza apoptoze kod embriona riba zebrica metodom akridin oranž	47
3.12. Statistička obrada podataka	47
4. REZULTATI	49
4.1. Optimizacija endogenih kontrola za metode qRT-PCR i Western blot	50
4.1.1. Optimizacija endogene kontrole za qRT-PCR	50
4.1.2. Optimizacija endogene kontrole za Western blot	51

4.2. Uloga Erk i Akt na eksprimiranje izoformi Gst kod embriona riba zebrića.....	52
4.2.1. Ispitivanje efikasnosti i specifičnosti Erk i Akt inhibitora na embrione riba zebrića.....	52
4.2.2. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena <i>gstp1-2</i> kod embriona riba zebrića.....	53
4.2.3. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena <i>gstal-3</i> i <i>gstml-3</i> kod embriona riba zebrića	54
4.2.4. Efekat inhibicije Erk na eksprimiranje gena <i>gstp1-2</i> tokom prelaska iz stadijuma blastule u stadijum segmentacije	55
4.2.5. Efekat inhibicije Erk na eksprimiranje transkripata <i>gstp1</i> i <i>gstp2</i>	57
4.3. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena I faze metabolizma ksenobiotika kod embriona riba zebrića.....	59
4.3.1. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena <i>cyp1a</i> kod embriona riba zebrića.....	59
4.3.2. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena <i>cyp3a65</i> kod embriona riba zebrića.....	60
4.4. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje antioksidativnih gena kod embriona riba zebrića	60
4.5. Uloga Erk i Akt na eksprimiranje gena <i>gstp1-2</i> kod embriona riba zebrića tokom oksidativnog stresa	61
4.5.1. Efekat tBHQ na eksprimiranje gena <i>gstp1-2</i> kod embriona riba zebrića	61
4.5.2. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena <i>nrf2a</i> kod embriona riba zebrića tretiranih sa tBHQ	64
4.5.3. Efekat tBHQ na aktivaciju Erk i Akt kod embriona riba zebrića	65
4.5.4. Efekat PMA na aktivaciju Erk i Akt kod embriona riba zebrića	66
4.5.5. Efekat PMA na eksprimiranje gena <i>gstp1-2</i> kod embriona riba zebrića	67
4.5.6. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena <i>gstp1-2</i> kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA	67

4.6. Uloga cAMP/Pka/Creb na eksprimiranje gena <i>gstp1-2</i> kod embriona riba zebrića..	68
4.6.1. Efekat forskolina na eksprimiranje gena <i>gstp1-2</i> kod embriona riba zebrića.....	68
4.6.2. Efekat inhibicije Erk na aktivaciju Creb kod embriona riba zebrića	69
4.6.3. Efekat PMA na aktivaciju Creb kod embriona riba zebrića	70
4.6.4. Kompjuterska analiza Creb vezujućih mesta na promotorskim sekvencama <i>gstp1</i> i <i>gstp2</i>	71
4.7. Uloga Pkc signalizacije u ranoj embriogenezi zebrića.....	72
4.7.1. Efekat PMA na razvoj i stopu preživljavanja embriona riba zebrića	72
4.7.2 Efekat PMA na pojavu apoptoze kod embriona riba zebrića.....	75
4.7.3. Efekat PMA na eksprimiranje pro- i antiapoptičnih gena kod embriona riba zebrića.....	76
4.7.4. Efekat PMA na eksprimiranje marker gena razvoja mozga	77
4.7.5. Efekat PMA na eksprimiranje antioksidativnih gena kod embriona riba zebrića.....	78
4.7.6. Efekat inhibicije Pkc, Erk i ROS na razvoj i preživljavanje kod embriona riba zebrića izloženih PMA	79
4.7.7. Efekat inhibicije Pkc na pojavu apoptoze kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA	80
4.7.8. Efekat inhibicije Pkc na eksprimiranje proapoptičnih gena kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA.....	81
4.7.9. Efekat inhibicije Pkc na eksprimiranje gena <i>pax2a</i> kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA	82
4.7.10. Efekat inhibicije Pkc na eksprimiranje gena <i>sod2</i> i <i>cat</i> kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA	83
5. DISKUSIJA	84
5.1. Uloga signalnih puteva kinaza Erk i Akt tokom ranog razvoja embriona riba zebrića.....	85
5.2. Uloga signalnog puta kinaza Pkc tokom ranog razvoja embriona riba zebrića.....	92

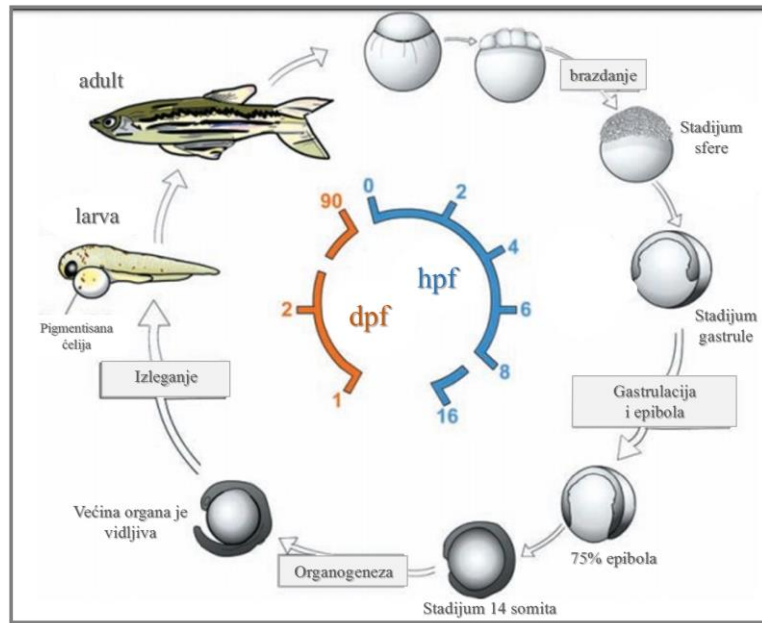
6. ZAKLJUČCI	99
7. LITERATURA	102
LISTA SKRAĆENICA	141
BIOGRAFIJA	145
Изјава о ауторству	146
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	147
Изјава о коришћењу	148

1. UVOD

1.1. Embrioni riba zebrica

Ribe zebrice (engl. *zebrafish*; lat. *Danio rerio*) predstavljaju jedan od najznačajnijih model organizama u genetici, razvojnoj biologiji, neurofiziologiji, biomedicini, ekotoksikologiji i drugim oblastima (Vascotto i sar., 1997; Grunwald i Eisen, 2002; Rubinstein 2003; Amsterdam i Hopkins, 2006; Jones 2010; Howe i sar., 2013). Ribice zebrice imaju višestruke homologe velikog dela humanih gena (Meyer i Van de Peer, 2005) koji su nastali kao posledica dupliciranja celog genoma (Amores i sar., 1998). Mnogi od ovih homologa su podvrgnuti podfunkcijskoj podeli (Postlethwait i sar., 2004), što čini zebrice pogodnim model organizmom za utvrđivanje funkcija gena u kojima njegov humani par ima višestruke uloge (Amores i sar., 1998). Zbog visokog stepena genetičke, morfološke i fiziološke homologije sa ljudima (Howe i sar., 2013; Kalueff i sar., 2014) zebrice imaju veliki doprinos u izučavanju različitih oblika kancera (Haldi i sar., 2006; Stoletov i Klemke, 2008; Schiavone i sar., 2014), bolesti (Chico i sar., 2008; Payne i Look, 2009; Jörgens i sar., 2012), signalnih puteva (Qin i sar., 2011; Xiong i sar., 2015) kao i puteva apoptoze (Yamashita 2003; Pyati i sar., 2007).

Njihovoj širokoj upotrebi doprinosi veliki broj jedinstvenih karakteristika poput brzog razvoja, lakog uzgajanja u kontrolisanim uslovima, velikog broja potomaka, transparentosti embriona i olakšan pristup eksperimentalnim manipulacijama. Zebrice imaju veoma kratak reprodukcioni ciklus, zrelost dostižu u uzrastu od 3 meseca, a jedna ženka može da produkuje do 100 jajnih ćelija po danu (Slika 1.1).

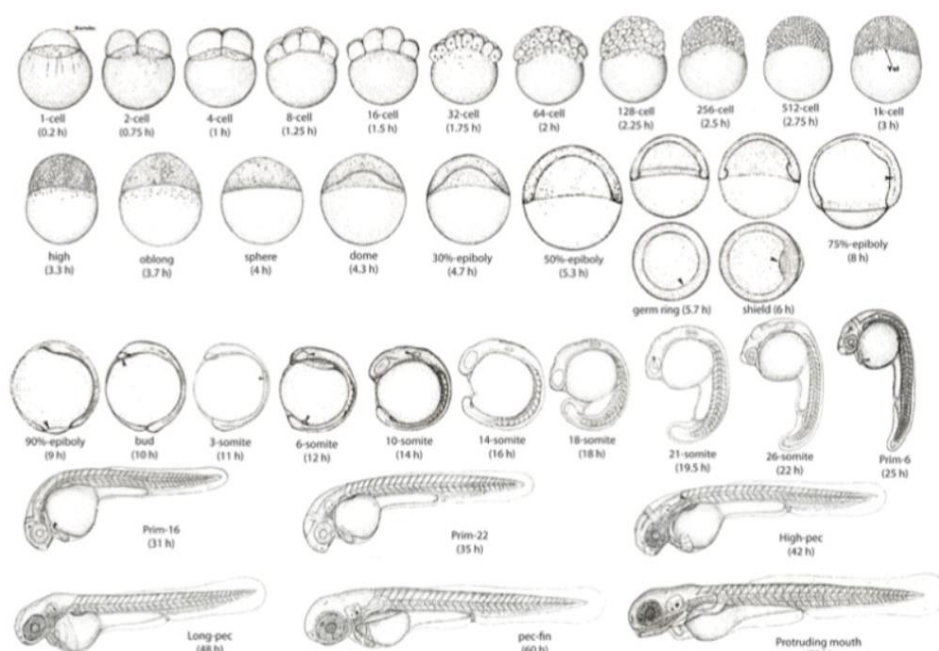


Slika 1.1. Životni ciklus ribe zeblice. Hpf – hours post fertilization, dpf – days post fertilization. Preuzeto uz izmene iz D'Costa i Shepherd, 2009.

U laboratorijskim uslovima svakodnevno može da se proizvede više hiljada embriona koji mogu da se koriste za različite eksperimentalne dizajne (Scholz i sar., 2008), a zbog male veličine jedinki u adultnom i larvenom stadijumu potrošnja hemikalija, kao i količina otpadnog materijala, je svedena na minimum (Hill i sar., 2005). Embrioni riba zebrica mogu efikasno apsorbovati jedinjenja male molekulske težine direktno iz vode što čini ove organizme pogodnim za ispitivanja antikancerskih agenasa (Parng i sar., 2002; Kari i sar., 2007). Takođe, ova osobina embriona riba zebrica, omogućuje primenu farmakoloških inhibitora ili stimulatora pojedinih signalnih puteva u svrhu modulacije njihove aktivnosti u tačno određenom vremenskom periodu, čime su postali jeftina alternativa skupim i vremenski zahtevnim transgenetičkim eksperimentima (Hawkins i sar., 2008). Na ovom modelu se mogu i sagledavati efekti ksenobiotika tokom embrionalnog razvoja koji su zbog etičkog aspekta teže izvodljivi na sisarskim modelima. Zbog ovih karakteristika embrioni riba zebričase često koriste kao model za predviđanje toksičnih efekata hemikalija tokom embrionalnog razvoja kod sisara (Brannen i sar., 2013). Međutim, postoji nekoliko osobina zebričase koje mogu ograničiti njihovo korišćenje u eksperimentima. Najočigledniji nedostatak zebričase, posebno u poređenju sa ljudima, je da nisu sisari, tako da je moguće da se hemikalije mogu

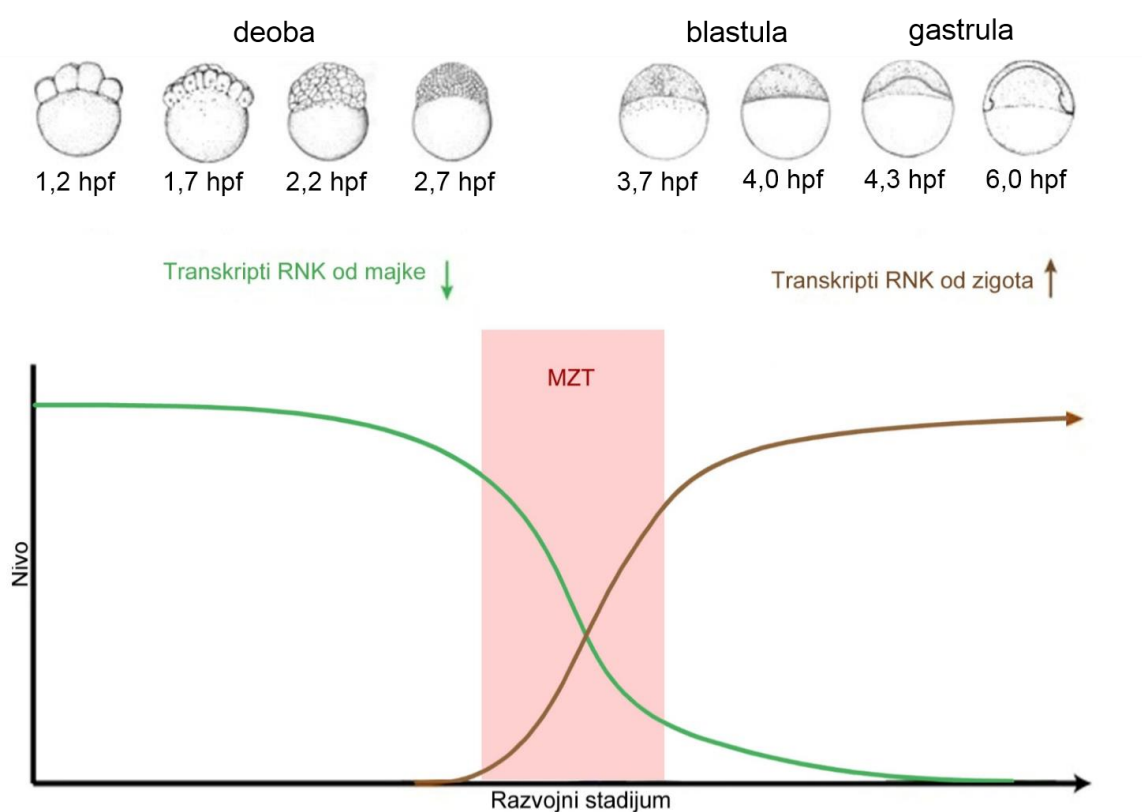
metabolisati na drugačiji način u odnosu na sisare. Takođe, nije moguće u potpunosti kontrolisati kolika će biti zaista doza hemikalije kojoj su embrioni ribe zebrice izloženi, jer ih one direktno apsorbuju iz spoljašnje sredine. Prisustvo horionskog omotača u ranim fazama razvoja može da ograničiti difuziju određenih hemikalija (Rubinstein, 2006; Cudd, 2005). Takođe, farmakološke supstance, naročito u velikim dozama, mogu da deluje neselektivno dovodeći do promena u nekoliko drugih proteina, a ne samo za specifični ciljani protein.

Embriogeneza kod riba zebrica se odvija na sličan način kao kod sisarskih embriona (McCollum i sar., 2011; Brannen i sar., 2013;). Jajne ćelije zebrica su telolecitne, a brazdanje je meroblastično i diskoidalno (Nagel, 2002). Embrionalni razvoj zebrica obuhvata sledeće stadijume: stadijum zigota (0 – 0,75 h), stadijum brazdanja (0,75 – 2,25 h), blastulu (2,25 – 5,25 h), gastrulu (5,25 – 10 h), stadijum segmentacije (10 – 24 h), stadijum faringule (24 – 48 h) i period izleganja (engl. *hatching*)(48 - 72h) (Kimmel i sar., 1995) (Slika 1.2).



Slika 1.2. Stadijumi embriona. Preuzeto iz Kimmel i sar., 1995.

Odmah po fertilizaciji otpočinje period tranzicije od majke do zigota (engl. *maternal to zygotic transition*, MZT). U ovom periodu materinski transkripti počinju da se eliminišu, ali i dalje dominantno učestvuju u inicijaciji transkripcije u poređenu sa zigotskim transkriptima (Stack i Newport, 1997; Tadros i Lipshitz, 2009; Despic i Neugebauer, 2018) (Slika 1.3). Nakon dva dana od procesa fertilizacije, uočavaju se sve telesne karakteristike kičmenjaka, uključujući podeljen mozak, oči, uši, kao i svi unutrašnji organi (Nüsslein-Volhard i Dahm, 2002).



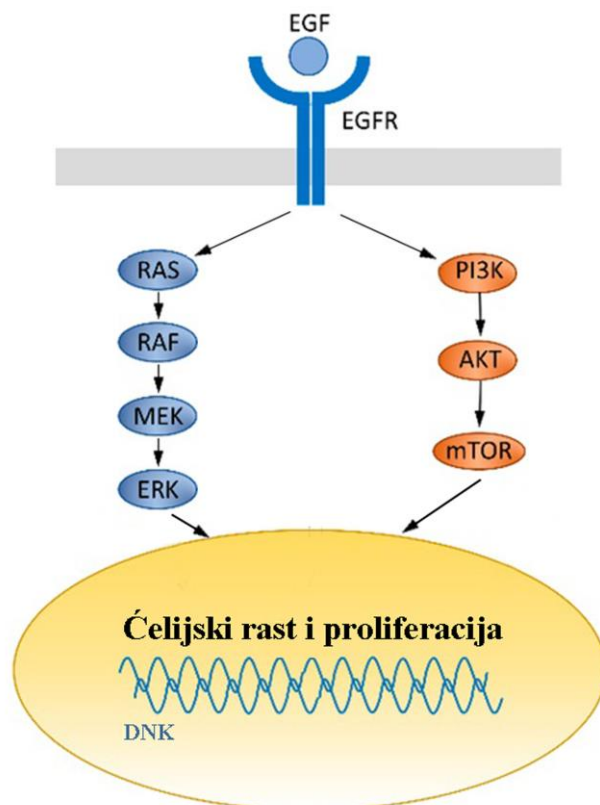
Slika 1.3. Šematski prikaz MZT. MZT se karakteriše značajnim prisustvom materinskih transkripata (zeleno) i njihovom zamenom sa zigotskim transkriptima koji se stvaraju *de novo* usled aktivacije zigotnog genoma (braon). Preuzeto uz izmene iz Laue i sar., 2019.

1.2. Signalni putevi

Signalni putevi su veoma značajni za kontrolu funkcije ćelija i organizma. Signalni putevi odgovaraju na različite stimuluse iz spoljašnje ili unutrašnje sredine dovodeći do odgovora ćelija i organizma. Od posebnog značaja je činjenica da različite hemikalije iz spoljašnje sredine mogu da menjaju signalne puteve i time da remete normalnu funkciju ćelije. Upoznavanje uloge signalizacije predstavlja značajan segment koji je ne samo kritičan za bolje razumevanje funkcije ćelija ili organizma već i za nastanak poremećaja funkcije usled narušenog prenosa signala unutar ćelije (Perkins i sar., 2013). U ovoj disertaciji fokus je stavljen na ekstraćelijskim signalima regulisane kinaze 1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, Erk), proteinske kinaze B (engl. *protein kinase B*, Pkb, odnosno Akt) i proteinske kinaze C (engl. *protein kinase C*, Pkc) koje predstavljaju kinaze signalnih puteva koji su uključeni u regulaciju važnih događaja u ćeliji, kao što su ćelijska proliferacija, migracija i formiranje tumora. Važno je još istaći da su signalni putevi visoko konzervisani kod metazoa/životinja (Adamska i sar., 2007; Martindale, 2005; Vallee i sar., 2008 Anklely i Johnson, 2004; Simmons i sar., 2009).

1.2.1. Erk

Među najviše proučavanim i najznačajnijim signalnim putevima u ćeliji je signalni put familije mitogenima aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK). MAPK su familija kinaza koje prenose signal sa površine ćelijske membrane do jedra, kao odgovor na veliki broj vanćelijskih nadražaja (Seeger i Krebs, 1995). Stimulusi, u koje između ostalih spadaju i ligandi koji aktiviraju receptore tirozin kinaze (engl. *tyrosine kinase receptor*, TKR), iniciraju aktivaciju RAS, koji zatim, aktivira kaskadu kinaza MEK (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*) i ERK, što rezultira aktivacijom transkripcionih faktora koji učestvuju u regulaciji proliferacije, preživljavanja i transformacije (Toelle i sar., 2015) (Slika 1.4).



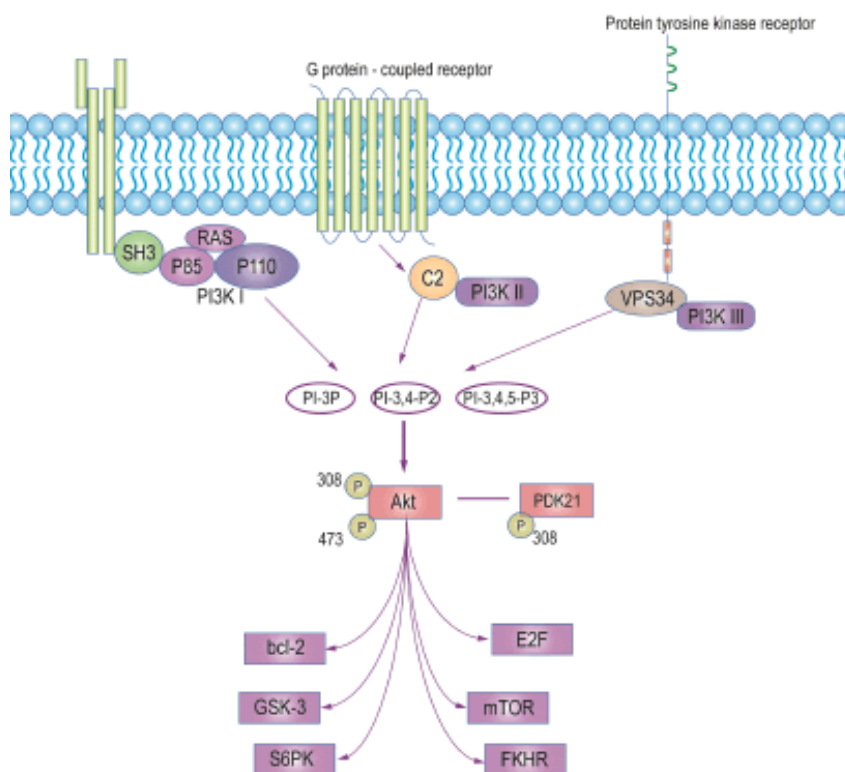
Slika 1.4. Šematski prikaz signalnog puta RAS-ERK.
Preuzeto uz izmene iz Miyamoto i sar., 2017.

Ova familija kinaza je na osnovu specifičnosti aktivacionog domena podeljena na tri podfamilije: ERK, JNK (engl. *C-Jun N-terminal kinases*) i p38 MAPK. Do danas je definisano šest različitih MAPK kaskada kod sisara: ERK1/2, JNK1/2/3, p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$, ERK3/4, ERK5 i ERK7. Ovi proteini uključeni su u različite značajne ćelijske procese kao što su proliferacija, ćelijski rast, diferencijacija, preživljavanje i razvoj, a igraju ključnu ulogu i u embriogenezi kičmenjaka (Krens i sar., 2006). Pokazano je da nedostatak ERK1 ili ERK2 proteina tokom ranog razvoja sisarskih embriona dovodi do kraniofacijalnih deformacija, srčanih defekata, poremećaja neurogeneze i drugih (Saba-El-Leil i sar, 2016). Kod embriona riba zebrica ovaj put je odgovoran za razvoj kardiovaskularnog sistema (Hong i sar., 2006), prednjeg mozga (Shinya i sar., 2001) kao i u sprečavanju apoptotičnih procesa (Zhu i sar., 2008). Pokazana je specifičnost u eksprimiranju određenog seta gena kod embriona riba zebrica sa utišanim (engl. *knockdown*) Erk1 i Erk2, kao i uticaj Erk1 i Erk2 na signalne puteve koji su odgovorni za razvoj mezoderma (Krens i sar., 2008). Aktivacija signalnog puta Mapk koja

uključuje VEGFR (engl. *vascular endothelial growth factors receptor*) pospešuje razvoj grudnog limfnog kanala u ranim fazama kod embriona riba zebrića. Takođe, signalni put MAPK reguliše ekspimiranje *NFE212* (engl. *p45 NFE2 related factor 2, NRF2*) gena koji kodira enzime II faze metabolizma ksenobiotika i antioksidativne proteine kod miševa i čoveka (Motohashi i Yamamoto, 2004; Shen i sar., 2004).

1.2.2. Pi3k/Akt

Fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K*) stimuliše aktivaciju AKT / protein kinaze B (AKT / PKB) i smatra se da je ova aktivacija jedna od najvažnijih koraka u regulaciji preživljavanja i proliferacije (Brazil i sar., 2002; Cantley, 2002). AKT mogu da aktiviraju različiti faktori iz spoljašnje sredine preko aktivacije GPCR (engl. *G protein-coupled receptor*) ili TKR receptora. Aktivacija ovih receptora dovodi do aktivacije PI3K, fosforilacije fosfatidilinozitola i aktivacije AKT posredstvom PDK (engl. *phospholipid dependent protein kinase*). Fosforilisan AKT dovodi do aktivacije većeg broja transkripcionih faktora (Deng i Liu, 2017) (Slika 1.5).



Slika 1.5. Šematski prikaz signalnog puta PI3K/AKT. Razni faktori rasta deluju putem signalnog puta PI3K/AKT. Preuzeto uz izmene iz Deng i Liu, 2017.

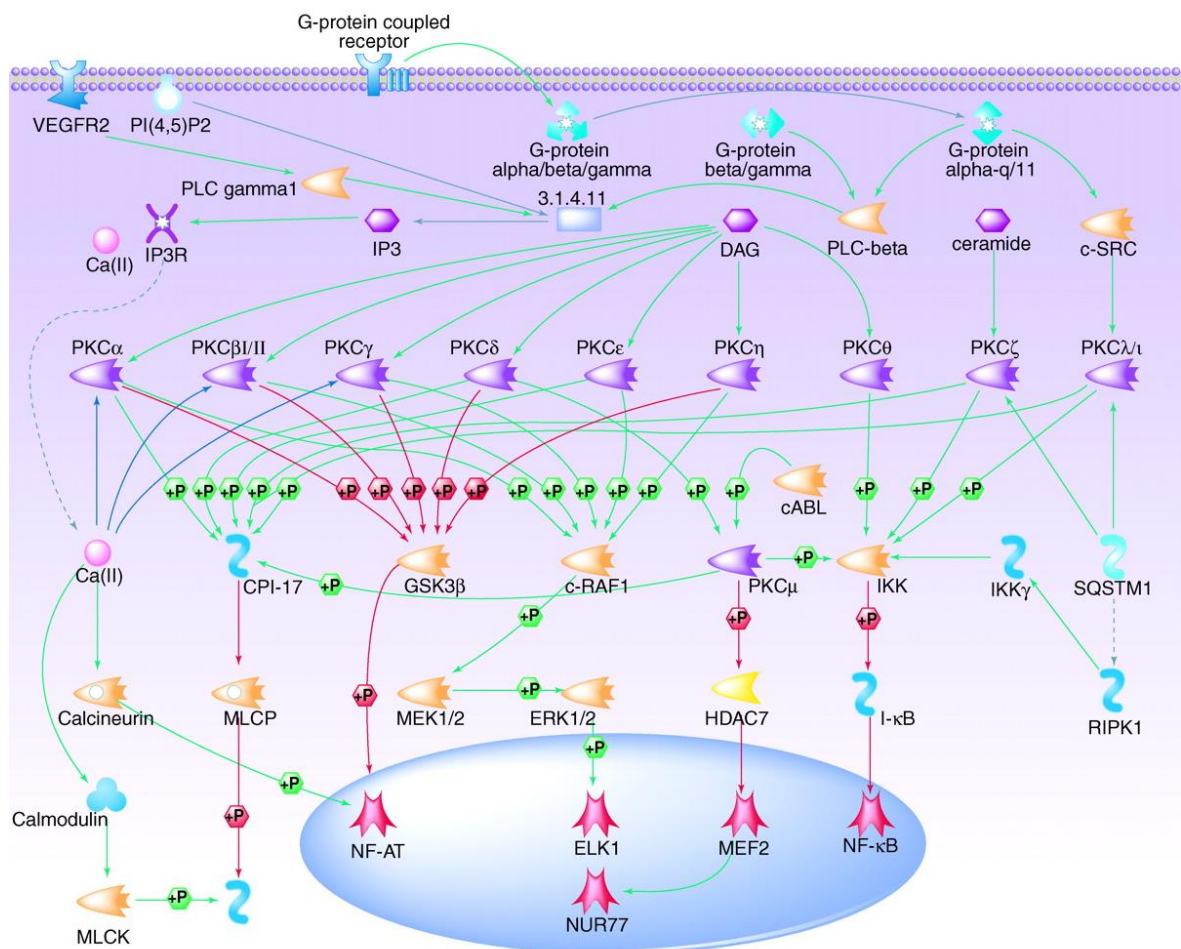
Identifikovano je nekoliko različitih proteina Akt kod riba zebrića: Akt1, Akt2, Akt2-like, Akt3a i Akt3b (Chen i sar., 2017 izvor: ZFIN: Zebrafish Model Organism Database). Njihove strukture su visoko konzervirane sa proteinima Akt u drugim vrstama kičmenjaka, što ukazuje i na slične funkcionalne uloge koje mogu imati u ribama zebrićama. Kod sisara je okarakterisano tri izoforme AKT: AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) i AKT3 (PKB γ). AKT1 je značajan tokom ranog razvoja, jer nedostatak ove kinaze dovodi do neonatalne smrti. AKT2 ima ulogu u regulaciji rezistencije na insulin i razvoj sindroma sličnog dijabetesu, dok AKT3 ima značajnu ulogu u razvoju mozga (Chen i sar., 2001; Cho i sar., 2001; Yang i sar., 2003; Garofalo i sar., 2003; Easton i sar., 2005).

Saznanja o ulozi signalizacije AKT tokom embriogeneze dobijena na sisarskim embrionima su pokazala da nedostatak ovog signalnog puta dovodi do retardacije rasta embriona, apoptoze u timusu i testisima, insulinske rezistencije i poremećaja u razvoju mozga (Bhaskar i Hay, 2007). U skladu sa ovim rezultatima, istraživanja na embrionima riba zebrića su pokazala da nedostatak Akt signalizacije dovodi do povećane smrtnosti embriona, poremećaja u razvoju kostiju, smanjenog nivoa insulina (Zhang i sar., 2017), poremećaja u razvoju arterija i vena (Hong i sar., 2006), smanjenog rasta mozga (Chen i sar., 2017). Ekspresijom konstitutivne aktivne forme Akt (engl. *myristoylated Akt*, myr-Akt) tokom embriogeneze ribe zebriće je dovelo do povećanja veličine mozga. Inhibicija Pi3k dovodi do smanjenja veličine mozga, ali ekspresijom myr-Akt vraća mozak embriona ribe zebriće na normalnu veličinu (Chen i sar., 2017). Osim toga, pokazano je da ekspresijom myr-Akt štiti ćelije neurona od apoptoze indukovane toplotnim šokom i UV svetlošću, što ukazuje da inhibicija smrti neuronskih ćelija može biti deo osnovnog uzroka povećanja veličine mozga. Ovi podaci pružaju osnovu za dodeljivanje uloge Pi3k/Akt u rastu mozga tokom embriogeneze ribe zebriće (Chen i sar., 2017).

1.2.3. Pkc

Protein kinaza C (PKC) je velika familija kinaza koja obuhvata oko 11 različitih izoformi. Kod sisara, PKC su podeljene u strukturno i funkcionalno različite grupe. Prva grupa su klasične PKC (engl. *conventional PKCs*, cPKCs: PKC α , PKC β I i II i PKC γ)

koji zahtevaju diacilglicerol (DAG) i Ca⁺⁺ za optimalnu aktivaciju. Druga grupa je poznata kao nove PKC (engl. *novel PKCs*, nPKC: PKC δ , PKC ϵ , PKC η i PKC θ) i ove kinaze su senzitivne na DAG, ali neosetljive na Ca⁺⁺. Treću grupu čine atipične PKC (engl. *atypical PKCs*, aPKCs: PKC ζ i PKC ι , λ -mišiji) i one su neosetljive i na DAG i na Ca⁺⁺ (Ohno i Nishizuka, 2002; Rosse i sar., 2010). PKC enzimi su uključeni u prenos signala sa membrane do jedra i aktiviraju se vezivanjem liganda za GPCR receptor preko različitih G-proteina (Teicher, 2006) (Slika 1.6).



Slika 1.6. Šematski prikaz uključenosti izoformi PKC u signalne puteve.
Preuzeto iz Teicher, 2006.

PKC regulišu različite procese u ćeliji, kao što su proliferacija, diferencijacija (Poli i sar., 2014), apoptoza (Li i sar., 1999; Musashi i sar., 2000), zapaljenski procesi (Pierce i sar., 1998; Pfeifhofer i sar., 2006;), sinaptička plastičnost (Perez i sar., 2001), dugoročna potencijacija i učenje (Saito i Shirai, 2002). Takođe, pokazano je da PKC regulišu

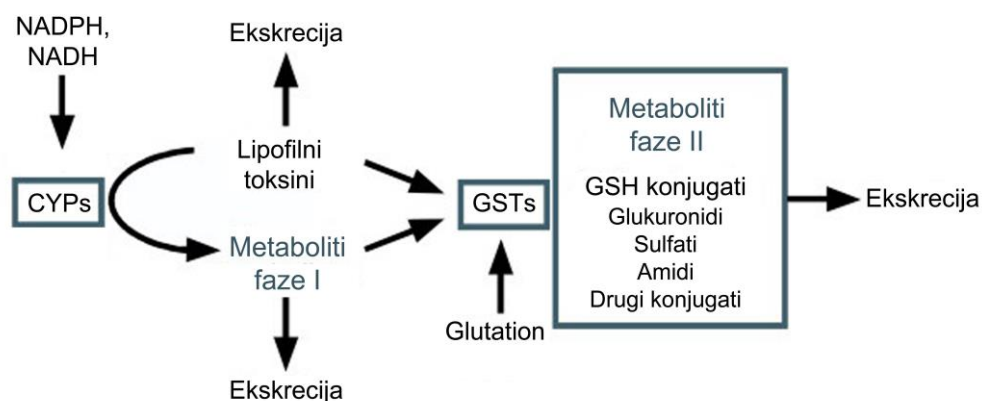
embriogenezu kod mnogih organizama uključujući voćne mušice, morske ježeve, nematode, miševе i gastropode (Gallicano i sar., 1997; Tabuse i sar., 1998; Wu i sar., 1998; Cox i sar., 2001; Dickey-Sims i sar., 2005; Zukaite i sar., 2016).

Nekoliko različitih izoformi Pkc su identifikovani u embrionima zebriца i to Pkc α , Pkc γ , Pkc β II, Pkc δ , Pkc ϵ , Pkc θ i Pkc ζ . Pkc α , γ , ϵ , θ i ζ su eksprimirani u centralnom nervnom sistemu (CNS) zebriца (Patten i sar., 2007). Pkc γ je eksprimiran u RB (engl. *Rohon Beard*) senzornim neuronima i u Mautnerovim ćelijama (engl. *Mauthner cells*). Pkc ϵ and ζ su takođe široko rasprostranjeni u CNS, dok su Pkc θ and β II eksprimirani u skeletnim mišićima, pogotovo u međusegmentalnim prorezima (Slatter i sar., 2005; Patten i sar., 2007). Korišćenjem genetičkog utišavanja (engl. *ablation*) različitih izoformi Pkc kod zebriца, ukazano je na ovu kinazu kao važnu u regulaciji nekoliko kritičnih procesa tokom embriogeneze. Te studije su pokazale da gubitak Pkc kod zebriца uzrokuje nenormalan koronarni razvoj indukovан timozinom beta (Bock-Marquette i sar., 2009), angiogenezu (Oubaha i sar., 2012), ubrzano razvijanje AMPRA-R (alpha-amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazolepropionat) receptora kod Mautnerovih ćelija (Patten i sar., 2010) i eksprimiranje kladina (Wu i sar., 2012). Sa druge strane, direktna aktivacija PKC kod humane embrionalne ćelijske linije je dovela do tranzicije epitela u mezenhim (Feng i sar., 2012) i vaskulogeneze kod ćelijske linije miša (Bekhite i sar., 2011), dok je indirektna aktivacija PKC sa ekstraktom cimeta dovela do zastoja u razvoju i apoptoze kod endotelne ćelijske linije čoveka i zebriца (Bansode i sar., 2013). Povećanje u aktivnosti PKC je primećeno kod pacova kod određenih patoloških stanja kao što je dijabetična embriopatija (Gäreskog i Wentzel, 2004; Zhao i sar., 2008). Takođe, prekomerna aktivacija Pkc pomoću PMA, aromatičnog analoga DAG i potentnog pokretača tumora, prouzrokovala je razvoj embriona puža koji su neorganizovani i zaostali (Zukaite i sar., 2016).

Iako navedeni literaturni podaci ukazuju da ERK, AKT i PKC regulišu važne etape tokom embriogeneze, regulacija mnogih drugih procesa tokom razvića organizma nije u potpunosti ispitana. S tim u vezi, postoji relativno malo podataka o mehanizmima uključenim u regulaciju eksprimiranja gena koji učestvuju u metabolizmu i odbrani embriona od dejstva ksenobiotika.

1.3. I i II faza metabolizma ksenobiotika

Kod riba zebrica je detektovano više izoformi enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika, pri čemu nivo ekspimiranja ovih gena pokazuje fluktuacije tokom rane embriogeneze, što je od značaja za normalni razvoj organizma (Glisic i sar., 2016; Timme-Laragy i sar., 2013). Mehanizam biotransformacije ksenobiotika može se podeliti u dve faze. I faza je faza oksidacije i vrši se pomoću citohrom P450 enzima (engl. *cytochrome P450*, CYP), a II faza je faza konjugacije ksenobiotika koju rade enzimi: sulfotransferaze, uridin difosfat glukuroniltransferaze, nikotinamin dinukleotid fosfat (NAD(P)H):guanin oksidoreduktaze (engl. *NAD(P)H:quinine oxidoreductases*, NQO), epoksi hidrolaze, glutation S-transferaze (Gst) i N-acetiltransferaze (Claudel i sar., 2007). Enzimi CYP učestvuju u reakcijama oksidacije, redukcije i hidroksilacije, što obezbeđuje dodavanje roditeljskoj molekuli odgovarajuće funkcionalne grupe i nastajanje metabolita, odnosno supstrata za enzime II faze metabolizma ksenobiotika. Konjugacija omogućava formiranje hidrofилnih metabolita, što olakšava njihovo izlučivanje iz organizma, putem urina i/ili fecesa i žuči. Aktivno izbacivanje formiranih konjugata iz ćelije se ostvaruju delovanjem transportnih proteina označenih kao MDR proteini (engl. *multidrug resistance-associated proteins*), ili ABC transporteri (Claudel i sar., 2007) (Slika 1.7).



Slika 1.7. I i II faza metabolizma ksenobiotika. Preuzeto uz izmene iz McElwee i sar., 2007.

Kako bi sačuvao svoj fiziološki balans, organizam troši energiju na detoksifikaciju i eliminaciju ksenobiotika. Kod riba koje su u razvoju i embriona, koji svu energiju crpe

iz žumanceta, ovaj utrošak energije može dovesti do sporijeg razvoja. Ukoliko organizam preživi ksenobiotički stres bez ikakvih morfoloških pokazatelja, posledice se mogu ispoljiti prilikom intraspecijske kompeticije kao zaostalost u poređenju sa jedinkama koje nisu pretrpele stres (Wiegand i sar., 2000). Merenje eksprimiranja gena uključenih u I i II fazu metabolizma ksenobiotika i odgovor na stres može omogućiti uvid u stvarni efekat neke supstance na organizam.

1.3.1. Enzimi Cyp

Citohromi P450 (CYP) su grupa enzima koja učestvuje u prvom koraku biotransformacije ksenobiotika. Prisutni su kod velikog broja vrsta, od mikroorganizama do biljaka i životinja. Indukcija CYP1A može dovesti do povećanog metabolizma toksičnih supstanci (Goldstein i Faletto, 1993). Zebrice imaju ukupno 94 gena *cyp* grupisanih u 18 familija i podeljenih u dve velike grupe, isto kao kod čoveka. Prvu grupu čine enzimi uključeni u sintezu i aktivaciju endogenih molekula (Cyp familije 5-51), dok drugu grupu čine enzimi uključeni u metabolizam ksenobiotika (Cyp familije 1-3, i delimično 4) (Goldstone i sar., 2010). Izoforme enzima CYP imaju ključnu ulogu u homeostazi žučnih kiselina, steroidogenezi, putu vitamina D i katabolizmu mnogih hormona koji imaju važnu ulogu u razvoju (Alsop i Vijayan, 2009; Bair i Mellon, 2004; Choudhary i sar., 2005; Hines, 2007; Hu i sar., 2004; Nebert i Dalton, 2006; Otto i sar., 2003; Stoilov i sar., 2001).

1.3.1.1. Cyp1a

Kod zebrica gensku familiju Cyp1 čine četiri podfamilije i pet gena: *cyp1a*, *cyp1b1*, *cyp1c1*, *cyp1c2* i *cyp1d1* (Yamazaki i sar., 2002; Godard i sar., 2005; Jönsson i sar., 2007; Goldstone i sar., 2009). Gen *cyp1a* ima slične strukture egzona kao humani *CYP1A1* i *CYP1A2* i indukuju ga agonisti aril hidrokarbonskog receptora (engl. *aryl hydrocarbon receptor* - Ahr). Cyp1a je veoma inducibilan u endotelu kardiovaskularnih tkiva riba (Stegeman i sar., 1989), uključujući srce i krvne sudove u ranim stadijumima razvoja zebrica (Andreasen i sar., 2002; Dong i sar., 2004; Yamazaki i sar., 2002). Najpotentniji induktor *cyp1a* je 2,3,7,8-tetrahlrodibenzodioxin (engl. 2,3,7,8-*Tetrachlorodibenzodioxin*, TCDD). U literaturi postoje podaci da TCDD dovodi do

povećanja u eksprimiranju *cyp1a* koje rezultira apoptozom embriona riba zebrića (Dong i sar., 2004). Pokazan je ekspresioni profil eksprimiranja gena *cyp1a* kod embriona riba zebrića u bazalnim uslovima. Transkript *cyp1a* je visoko prisutan do 4 hpf, što ukazuje na prisustvo materinskih transkripata. Nakon 4 hpf je primećen pad *cyp1a* transkripta, a niski nivoi eksprimiranja ovog gena ostaju tokom perioda gastrule i segmentacije. Tokom perioda faringule (48 hpf) dolazi do porasta u količini transkripta koja se zadržala na približno istom nivou do 120 hpf (Glisic i sar., 2016).

1.3.1.2. Cyp3a65

Kod zebrića gensku familiju Cyp3 čini 5 gena: *cyp3a65*, *cyp3c1*, *cyp3c2*, *cyp3c3* i *cyp3c1*. *cyp3a65* je jedina izoforma Cyp3a podfamilije kod zebrića i deli 54% identičnosti sa humanim *CYP3A4* (Goldstone i sar., 2010). Članovi CYP3A podfamilije se najviše eksprimiraju u digestivnom i respiratornom traktu kičmenjaka. Oni spadaju u monooksigenaze koje metabolišu raznovrsne lipofilne organske supstance i steroidne hormone (Ekins i sar., 2003). Eksprimiranje *cyp3a65* se može povećati sa PXR (engl. *Pregnane X Receptor*) agonistima, pregnenolonom, fenolbarbitolom, deksametazonom, rifampicinom, ali i TCDD kod ribe zebriće (Tseng i sar., 2005; Kubota i sar., 2015). Detektovan je na veoma niskom nivou u stadijumu faringule (24 hpf) sa blagim porastom kod 72 hpf embriona, a vrhunac eksprimiranja dostiže kod 120 hpf embriona (Glisic i sar., 2016) sa visokim nivoima u prednjem crevu, a kasnije i u jetri i crevima odraslih jedinki. U drugima organima kao što su mozak, škrge i oči je slabo eksprimiran (Tseng i sar., 2005).

1.3.2. Enzimi Gst

GST superfamilija se sastoji od velikog broja članova koji su uključeni u regulaciju redoks ravnoteže i metabolizma ksenobiotika. Glavna uloga ove familije proteina je transfer tripeptida gama-glutamil-cisteinil-glicina, odnosno redukovane forme glutationa (GSH) na veliki broj visoko genotoksičnih molekula (Schnekenburger i sar., 2014). GST su jedni od enzima koji pripadaju II fazi metabolizma ksenobiotika. Konjugacija elektrofilnih komponenti ili metabolita I faze sa GSH je katalisana sa enzimom GST, odnosno u ovoj fazi dolazi do konvertovanja supstrata u jedinjenja koja

se bolje rastvaraju u vodi, a time je olakšano i njihovo izlučivanje iz organizma (Sheehan i sar., 2001).

Velika multigenska GST familija se sastoji od tri podfamilije: citoplazmatske (cGSTs) koja obuhvata sedam klasa (*Alpha, Mu, Pi, Theta, Sigma, Omega, Zeta*), mitohondrijska (kGSTs) kojoj pripada klasa *Kappa* i mikrozomalne (engl. *membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione*, MAPEG). Podela je napravljena na osnovu specifičnosti prema supstratu, proteinske sekvence i imunološke unakrsne reaktivnosti. cGST su najsloženije i veoma povezane sa razvojem bolesti kod ljudi (Wu i Dong, 2012; Schechter i sar., 1992; Kim i sar., 2010; Hayes i sar., 2005; Mannervik i sar., 1992), a dosadašnji podaci potvrđuju njihovu ulogu u olakšavanju rezistencije na lekove kod različitih tipova tumora kod čoveka (Asojo i sar., 2007; Kelleher i sar., 2013). Druge klase enzima cGst: *Beta, Delta, Epsilon, Lambda, Phi, Rho* i *Tau* identifikovane su kod nesisarskih organizama, uključujući biljke, insekte, bakterije, gljive, crevne gliste, ribe i druge (Blanchette i Singh, 2007).

1.3.2.1. Gst Alpha

Klasa *Alpha* enzima GST (GSTA) vrši konjugaciju 4-hidoksinonenala, kao i drugih reaktivnih produkata lipidne peroksidacije sa GSH. 4-hidroksinonenal je glavni produkt razgradnje lipidnih peroksida i potentan ćelijski kancerogen i mutagen. Ribe sadrže relativno velike količine polinezasićenih masnih kiselina, tako da je zaštita od toksičnih efekata produkata lipidne peroksidacije veoma bitna (Henson i sar., 2000). Kod zebrica gen koji kodira *Gsta* i još nekoliko gena pored *ARE* (engl. *antioxidant response element*) sadrži i *XRE* (engl. *xenobiotic response element*) sekvencu (Timme-Laragy i sar., 2009). Skorija ispitivanja su pokazala da GSTA čestvuje u stvaranju otpornosti na lekove kod p53-mutiranih ćelija raka pluća (Russo i sar., 2017). Kod zebrica geni za enzime klase *Gst Alpha* su pokazali visoku ekspimiranost u crevima i gonadama u poređenju sa drugim klasama *Gst*. Gen *gsta1* je najviše ekspimiran u mozgu ženki i crevima mužjaka, dok je *gsta2* dominantno ekspimiran u škragama ženki, a kod mužjaka u jetri, bubrezima, crevima i testisima. Gen *gsta3* je ekspimiran u crevima mužjaka (Glisic i sar., 2015).

1.3.2.2. Gst Mu

Klasa *Mu* enzima GST (GSTM) ima ulogu u detoksifikaciji elektrofilnih jedinjenja, uključujući kancerogena jedinjenja, terapijske lekove, toksična jedinjenja i produkte oksidativnog stresa (Olsvik i sar., 2010). Kod riblje vrste *Kryptolebias marmoratus* pokazano je konstitutivno eksprimiranje *gstm* u svim razvojnim fazama. Najveće eksprimiranje je zabeleženo u embrionalnom stadijumu ove ribe četiri dana nakon fertilizacije (Yu i sar., 2008). Analizom aminokiselinske sekvence pokazano je da Gstm sadrži karakterističnu strukturu, tzv. *mu* petlju sastavljenu od sedam aminokiselina, koja je važna determinanta afiniteta enzima prema supstratu. Kod zebrića geni *gstm* su pokazali visoko eksprimiranje u gonadama i mozgu kao i u bubrezima i škrigama, sa tim da je izražajna polna razlika u korist ženki. U preostalim ispitivanim tkivima je registrovano umereno eksprimiranje *gstm* (Glisic i sar., 2015). Istraživanja su pokazala da nedostatak Gstm vodi ka specifičnim kliničkim simptomima i kancerogenezi (Kim i sar., 2010). Utvrđeno je da GSTM deluje sinergistički sa MDR transporterom u cilju smanjenja efekata hemoterapeutskog leka za nekoliko različitih kancera kod čoveka (Depeille i sar., 2004).

1.3.2.3. Gst Pi

Klasa *Pi* enzima GST (GSTP) je najzastupljeniji član GST familije proteina kod kičmenjaka. Pronađen je u mnogim normalnim i malignim tkivima. GSTP enzimi su veoma efikasni u konjugaciji kancerogenih benzo [a] pirenskih derivata sa GSH, kao i u detoksifikaciji elektrofilnih α , β -nesaturisanih karbonilnih jedinjenja. Eksprimiranje gena *gstp* može biti indukovano delovanjem elektrofilnih jedinjenja, a transkripcioni faktor Nrf2 posreduje u ovoj indukciji (Suzuki i sar., 2005). Gst *Pi* pripada citoplazmatskoj familiji enzima GST kodiranih jednim (kod ljudi i pacova) odnosno sa dva (kod miševa i zebrića) gena (Hayes i sar., 2005). GSTP je široko rasprostranjen u tumorskim ćelijama i usko je povezan sa ćelijskom karcinogenezom, formiranjem tumora i otpornošću tumora na lek (Chen i sar., 2005). GSTP enzimi mogu indukovati ćelijsku apoptozu kao odgovor na ćelijski stres aktiviranjem MAPK, MKK4 (engl. *Mitogen-activated protein kinase kinase 4*), nizvodnih komponenti signalizacije JNK signalizacije i kinaze p38 (Gate i sar., 2004; Sau i sar., 2012). GSTP, pored toga što

podstiče rezistenciju tumora na lekove i što deluje kao enzim koji vrši detoksifikaciju može da deluje i kao inhibitor MAPK signalizacije kako bi omogućio preživljavanje tumorskih ćelija. Takođe, GSTP predstavlja protein koji povezuje poput skele (engl. *scaffold protein*) i ujedinjuje različite članove signalnih puteva (Dong i sar., 2018). Kod zebrica geni za enzyme klase Gst *Pi* pokazuju veoma visoko ekspimiranje u škragama mužjaka i jajnicima, praćeno visokim ekspimiranjem u svim ostalim tkivima, sa umerenim ekspimiranjem u jetri ženki. I kod klase Gst *Pi* postoji izražena polna razlika, u ženskim gonadama je veće ekspimiranje dok je u jetri i mozgu veće ekspimiranje kod mužjaka. *gstp1* je pokazao veoma visoko ekspimiranje u tkivima zebrice, za razliku od izraženo niskog ekspimiranja *gstp2* (Glisic i sar., 2015).

1.3.2.4. Regulacija ekspimiranja Gst

Regulacija ekspimiranja GST se ostvaruje preko ARE ili EpRE (engl. *Electrophile-Responsive Element*) sekvenci (Blanchette i Singh, 2007). Transkripcioni faktor NRF2 je jedan od glavnih induktora enzima GST (Motohashi i Yamamoto, 2004). NRF2 ima značajnu ulogu u regulaciji ekspimiranja gena i za antioksidativne i za enzyme II faze metabolizma ksenobiotika putem vezivanja za ARE sekvencu u promotorima gena za NAD(P)H:kinon oksidoreduktazu, GST, hem oksigenazu 1, γ -glutamat cistein ligazu, protein toplotnog stresa (engl. *heat shock protein*, hsp70), glutation reduktazu, glutation peroksidazu, katalazu i superoksid dismutazu (Rushmore i sar., 1991; Friling i sar., 1990; Alam i sar., 1995; Mulcahy i sar., 1997; Kobayashi i Yamamoto, 2006; Kobayashi i sar., 2009). Jedan od načina aktivacije NRF2 transkripcionog faktora uključuje signalne puteve PI3K/AKT, MAPK i PKC (Huang, i sar., 2000; Kang i sar., 2002; Kang i sar., 2003; Zipper i Mulcahy, 2000). Tako je pokazano da PKC vrši fosforilaciju NRF2 prilikom tretmana humane HepG2 ćelijske linije sa forbol 12-miristat 13-acetatom (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA) i *tert*-butilhidrokinonom (engl. *tert-butylhydroquinone*, tBHQ). Peroksinitrit aktivira vezivanje NRF2 za ARE putem aktivacije signalnog puta PI3K kod H4IIE hepatoma pacovske linije (Huang i sar., 2000; Kim i Kim, 2004). tBHQ indukuje GST koje je posredovano aktivnošću kinaza PI3K i AKT kod pacovske H4IIE i kinaza ERK kod humane HepG2 ćelijske linije (Kang i sar., 2001; Zipper i Mulcahy, 2000).

Kontrola eksprimiranja gena *GSTP* je najbolje izučena i predstavlja kompleksan proces koji uključuje brojne signalne faktore i signalne kaskade. Prvo, prisustvo ARE sekvence kod *GSTP* omogućava aktivaciju preko transkripcionog faktora NRF2 (Taguchi i sar., 2011). Kod gena *Gstp* kod pacova identifikovana su dva elementa koja odgovaraju na PMA (engl. *PMA-response element*, PRE) i koji se smatraju značajnim za bazalno i indukovano eksprimiranje ovog gena (Matsumoto i sar., 1999). Element koji odgovara na cAMP (engl. *cAMP response element*, CRE) je pronađen u humanom *GSTP*, što je dalje omogućilo identifikaciju mehanizma koji zavisi od CRE-vezujućeg proteina (CREB) u regulaciji *GSTP* (Lo i Ali-Osman, 2007). Takođe je pokazano da ERK i PKB/AKT kontrolišu eksprimiranje gena *Gstp* kod pacova preko transkripcionih puteva NRF2, aktivator proteina 1 (engl. *activator protein 1*, AP-1) (Chang i sar., 2010; Tsai i sar., 2010) ili nuklearnog faktora kappa B (NF-kB) (Lin i sar., 2014).

Kod riba zebrica kao posledica genske duplikacije nastala su dva člana gena *gstp*: *gstp1* i *gstp2* kao i dva paraloga *nrf2*: *nrf2a* i *nrf2b*. *Nrf2a* i *nrf2b* imaju podeljene funkcije, pri čemu *Nrf2a* prvenstveno deluje kao transkripcioni aktivator, a *Nrf2b* deluje kao transkripcioni represor (Timme-Laragy i sar., 2012). Slično kao kod adultnih ćelija, i kod embriona riba zebrica je *Nrf2a* identifikovan kao glavni regulator eksprimiranja *gstp1-2* (Suzuki i sar., 2005). *Nrf2a* se vezuje direktno za proksimalne ARE sekvence koji se nalaze 50 bp uzvodno od startnog mesta transkripcije *gstp1* (Suzuki i sar., 2005). Međutim, složene fluktuacije u eksprimiranju gena *gstp1-2* tokom embriogeneze i njeno modifikovanje na veliki broj supstanci koje ne aktiviraju *Nrf2a* (Garner i Di Giulio, 2012) ukazuju na raznoliku regulaciju ovih izoformi *Gstp*. Pored tBHQ za koji je pokazano da dovodi do povećanja eksprimiranja gena *gstp1*, *gstp1* i mikrozomalni *gst* putem oksidativnog stresa i aktivacije *nrf2* (Hahn i sar., 2015; Kobayashi i sar., 2009), izlaganja embriona riba zebrica policikličnim aromatičnim ugljovodonicima (Van Tiem i Di Giulio 2011; Timme-Laragy i sar., 2009), atrazinu (Wiegand i sar., 2000; Wiegand i sar., 2001) i polibrominarim difenil etrima (Usenko i sar., 2008) takođe povećavaju eksprimiranje *gstp1*.

Reichard i sar., 2007; Voelker i sar., 2008; Yoshida i sar., 2001). Kao rezultat duplikacije genoma, zebriće imaju višestruke gene za hem oksigenazu: *hmox1* (*hmox1a* i *hmox1b*) i *hmox2* (*hmox2a* i *hmox2b*) (Holowiecki i sar., 2016). Najznačajnija razlika u eksprimiranju paraloga *hmox1a* je značajno visok nivo eksprimiranja kod 24 hpf embriona riba zebrića u odnosu na *hmox1b*. Ovi podaci sugeriraju da je Hmox1a, a ne Hmox1b, neophodan za ranu razvojnu funkciju koja može ili ne mora biti povezana sa ulogom u reakciji oksidativnog stresa. U bazalnim uslovima *hmox1* je zadržao nizak nivo eksprimiranja tokom čitavog perioda ispitivanja (0 - 120 hpf) (Glisic i sar., 2016).

1.4.2. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza vrši transformaciju superoksida u vodonik-peroksid (H_2O_2) i divalentni kiseonik (Brammell i sar., 2010). U bazalnim uslovima nivoi eksprimiranja gena *sod2* je visok tokom ranog razvoja (0–4 hpf), nakon čega sledi dramatičan pad i ponovni ali blagi porast kod 96 hpf embriona koji se održava do 120 hpf (Glisic i sar., 2016). Pokazano je da se aktivnost Sod smanjuje nakon izlaganja embriona riba zebrića fungicidima i endokrinim ometačima (engl. *endocrine disrupting chemicals*, EDC) (Li i sar., 2018; Wu i sar., 2011).

1.4.3. Katalaza

Katalaza obezbeđuje zaštitu organizma od oksidativnih oštećenja tako što omogućava uklanjanje vodonik-peroksida iz organizma, njegovim konvertovanjem u vodu i kiseonik (Woo i sar., 2009). U bazalnim uslovima kod embriona riba zebrića nivo eksprimiranja *cat* je izraženo visok tokom ranog razvoja (0 – 4 hpf), nakon čega sledi dramatičan pad, da bi kod 48 hpf embriona započeo linearan rast do 96 hpf embriona koji se održava do 120 hpf (Glisic i sar., 2016). Pokazano je da je aktivnost katalaze u obrnutoj korelaciji sa količinom vodonik-peroksida, odnosno bila je niska pri najvišim nivoima H_2O_2 , a takođe je pokazana inhibicija aktivnosti katalaze nakon izlaganju embriona riba zebrića EDC, kao što su bisfenol A i nonilfenol, i pesticidima koji su bazirani na fosalonu i cipermetrinu (Gauron i sar., 2016; Wu i sar., 2011; Korkmaz i sar., 2018).

1.4.4. Glutation peroksidaza

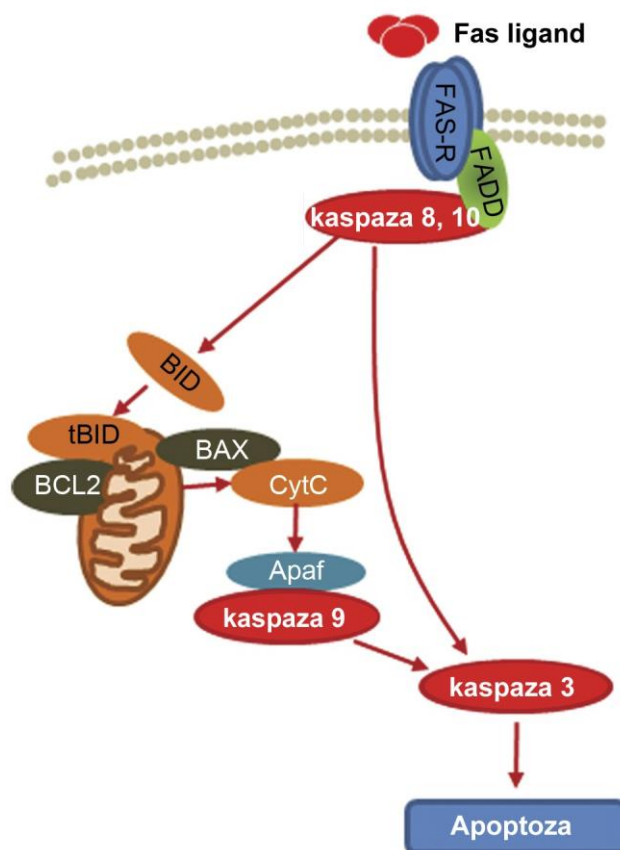
Slično katalazi, glutacion peroksidaza omogućava uklanjanje vodonik-peroksida iz organizma, njegovim konvertovanjem u vodu i kiseonik (Brammell i sar., 2010). U bazalnim uslovima kod embriona riba zebrica nivo eksprimiranja *gpx* je visok tokom ranog razvoja (0 – 4 hpf), nakon čega sledi pad i ponovni ali blagi porast kod 96 hpf embriona koji se održava do 120 hpf (Glisic i sar., 2016). Pokazano je da gore navedeni endokrini ometači i pesticidi inhibišu aktivnost Gpx (Wu i sar., 2011; Korkmaz i sar., 2018;).

1.5. Apoptoza

Apoptoza (programirana ćelijska smrt) je važna u normalnim biološkim procesima i patogenezi kod kičmenjaka. Molekularna mašina koja izaziva apoptozu je veoma očuvana između riba zebrica i sisara (Eimon, 2014). Ustanovljena je razlika između nižih i viših kičmenjaka u periodu kad se može izazvati apoptoza. Kod embriona čoveka i miša, apoptoza se može izazvati u stadijumu blastociste (Brison i Schultz 1997; Jurisicova i sar., 1996), što je mnogo ranije nego što je pokazano kod embriona ribe zebrice i žabe (*Xenopus leavis*), kod kojih se javlja tokom gastrule (engl. *midgastrula*) (Ikegami i sar., 1999). Zebrice su otporne na pojavu apoptoze pre nego što dostignu MZT stadijum, odnosno stadijum „prelaska sa majke na zigot“ koje se javlja 4 – 7 hpf.

Postoje dva ključna apoptotična signalna mehanizma kod sisara i drugih kičmenjaka: unutarćelijski (ili mitohondrijski) i vanćelijski (ili receptora smrti) put. Unutrašnji put se može aktivirati oštećenjem ćelija, uklanjanjem faktora rasta ili delovanjem hemoterapijskih lekova. Ovaj put je regulisan familijom gena BCL-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) i aktivacijom kaspaze 9. Neki članovi familije kao što su BCL-2 i E3 ubikvitin protein ligaza (engl. *mouse double minute 2*, MDM2) inhibišu apoptozu, dok drugi kao što su BAX (engl. *BCL2 associated X*), BAK (engl. *BCL2-antagonist/killer 1*) i PUMA (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) dovode do ćelijske smrti. Promene u mitohondrijama tokom apoptoze, posebno oslobađanje citohroma c, dovode do aktivacije kaspaznih proteaza koje zatim aktiviraju apoptotične procese u ćeliji

(Youle i Strasser, 2008; Zhou i sar., 2009). Pokazano je da se kaspaza 9 aktivira citohromom c iz mitohondrija stvaranjem kompleksa sa deoksiribonukleotidom (dATP) i Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*) (Pyati i sar., 2007). Međutim, u drugim istraživanjima ekspimiranje *kaspaze 9* je bilo povećano iako nije došlo do povećanja ekspimiranja *apaf1*, što sugerise da *apaf-1* nije ključan faktor u aktivaciji ovog proteina (Zhou i sar., 2015). Spoljašnji put se pokreće aktiviranjem receptora smrti i funkcioniše preko kaspaze 8 i 10. Ovaj put igra važnu ulogu u funkcionisanju imunog sistema i homeostaze (Wilson i sar., 2009; Youle i Strasser, 2008) (Slika 1.9).



Slika 1.9. Model apoptoze. Pokretanje mehanizma apoptoze preko FAS receptora (spoljašnji put) i aktiviranje unutrašnjeg apoptotičnog puta preko citohroma c (CytC). Preuzeto uz izmene iz Catts i Shannon Weickert, 2012.

Unutrašnji i spoljašnji apoptotični signali aktiviraju transkripcioni faktor p53 koji se premešta u jedro i dovodi do ekspimiranja proapoptotskog BAX gena što dalje aktivira kaspazu 3 i ubrzava ćelijsku smrt (Sheikh i Fornace, 2000). Pokazano je da su geni *p53* i *mdm2* uključeni u apoptozu ćelija usled zračenja embriona riba zebrića (Zhou i sar.,

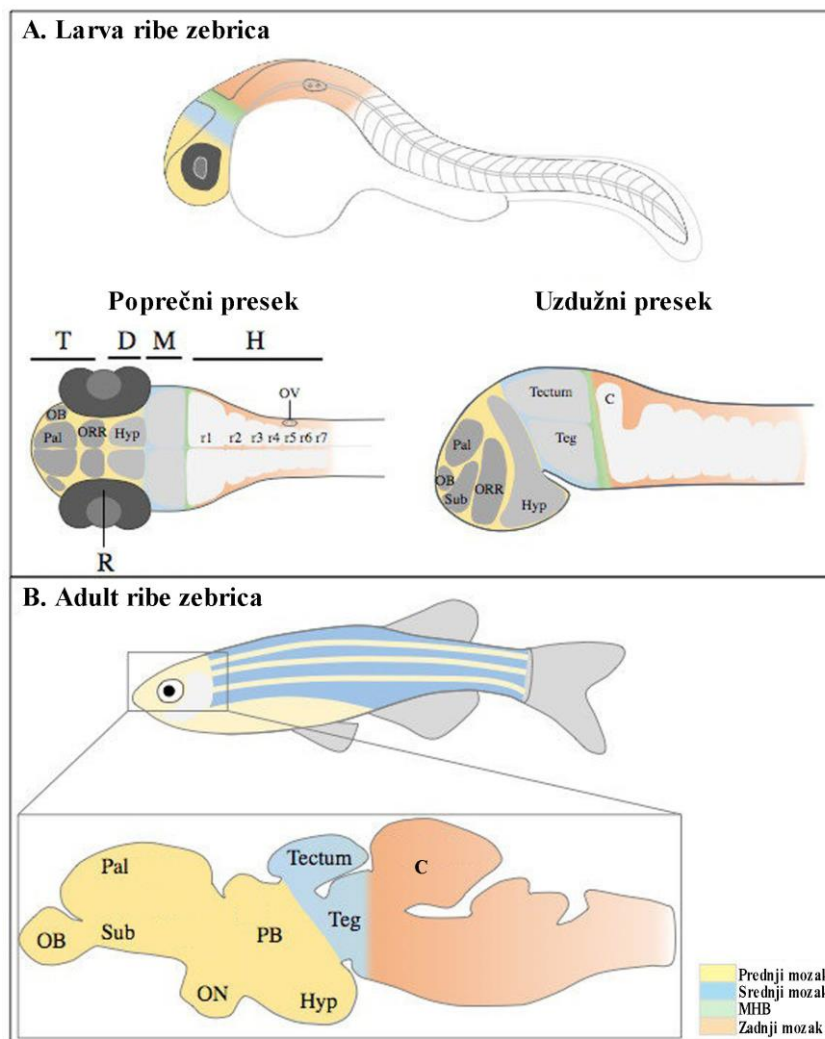
2015), a da je i regulacija eksprimiranja gena *puma* zavisna od *p53* (Kratz i sar., 2006). Familiju Bcl-2 čine proapoptotični i antiapoptotični proteini koji regulišu ulogu mitohondrija u ćelijskoj smrti, a antiapoptotični efekat Bcl-2 zavisi od p53 (Bernardi i sar., 2001; Gottlieb, 2001).

Kaspaze koje pripadaju klasi I (2, 8, 9 i 10) regulišu uzvodni deo kaspazne kaskade preko prodomena na N-kraju koji su povezani sa specifičnim molekulima smrti. Kaspaze klase II (3, 6, 7), sa kratkim prodomenom na N-kraju deluju tako što ciljaju ćelijske proteine za proteolitičko cepanje (Colussi i Kumar, 1999; Cryns i Yuan, 1998). Kod riba zebrica je pronađeno nekoliko kaspaza (2, 3, 6, 7 i 9) usled čega se pretpostavlja da i one poseduju kaskadu kaspaza koja indukuje apoptozu slično kao što je okarakterisano u sisarskim ćelijama (Yabu i sar., 2001a). Usled visokog nivoa eksprimiranja gena za kaspazu u ranim stadijumima embriona (4 – 1024 ćelija, odnosno 1 – 3 hpf), smatra se da je ona materinskog porekla. Normalno razvijeni embrioni pokazuju nisku aktivnost kaspaze 3 koja je lokalizovana na pojedinačne, apoptotične ćelije, a nakon gastrulacije (10 hpf) se eksprimira i zigotska kaspaza 3 (Yabu i sar., 2001a; Yabu i sar., 2001b).

1.6. Razvoj nervnog sistema

Neurogeneza opisuje proces kojim se od nediferenciranih neuronskih progenitorskih ćelija stvaraju zreli i funkcionalni neuroni. Najpre dolazi do indukcije neuralnih progenitora i ćelijske deobe kojom se povećava broj progenitora, što dalje prati diferencijacija na post-mitotičke neurone. Svaki od ovih koraka je prostorno i vremenski orkestriran u cilju generisanja višestrukih neuronskih i glijalnih ćelijskih tipova koje će na kraju činiti zreli CNS (Schmidt i sar., 2013).

Zebrice su homologne drugim kičmenjacima višeg reda u pogledu procesa molekularne signalizacije, genetičkih kompozicija i strukture tkiva/organa, kao i u razvoju nervnog sistema. Mozak zajedno sa centralnim nervnim sistemom je razvijen u toku prva tri dana (Slika 1.10), a razvojni procesi i mehanizmi centralnog nervnog sistema zebrice i drugih kičmenjaka su dobro konzervirani (Belousov 2011; Howe i sar., 2013; Kalueff i sar., 2014; Mansuri i sar., 2014).



Slika 1.10. Razvoj mozga ribe zebriće.

(A) Šematski prikaz embrionalnog mozga (30 hpf): prednji mozak (žuto), srednji mozak (plavo), MHB (engl. *midbrain-hindbrain boundary*) granica srednjeg i zadnjeg mozga (zeleno), zadnji mozak (narandžasto). Šema poprečnog i uzdužnog preseka prikazuje začetke moždanih struktura. Prednji mozak je podeljen u veliki mozak (tamnija siva) i međumozak (sadrži hipotalamus (engl. *hypotalamus*, hyp), svetlije siva). (B) pojednostavljeni prikaz mozga adultne ribe zebriće i njegovih glavnih domena. C - (engl. *cerebellum*, mali mozak); D - (engl. *diencephalon*, međumozak); M (engl. *midbrain*, srednji mozak); H- (engl. *hindbrain*, zadnji mozak); OB (engl. *olfactory bulb*); ON - optički nerv; ORR - (engl. *optic recess region*, optička oblast); OV - (engl. *otic vesicle*, ušna vezikula); Pal (engl. *pallium*); PB - (engl. *pineal body*, epifiza); R - retina; r1-r7 rombomere; Sub (engl. *sub-pallium*); Teg (engl. *tegmentum*). Preuzeto uz izmene iz Vaz i sar., 2019.

Sinapsin 2a (engl. *Synapsin II a*, Syn2a) je neuronski fosfoprotein koji vezuje male sinaptičke vezikule kako bi izazvao dalju sinaptogenezu kod sisara, što ga čini

markerom formiranja sinapsi. Ima važnu ulogu u ranom razvoju CNS, kao što je neuralna diferencijacija i stvaranje sinapsi, a i u otpuštanju neurotransmitera (Garbarino i sar., 2014; Kao i sar., 1998). Kod embriona riba zebrica je pokazano da njihovo izlaganje trifenilfosfatima rezultira smanjenim eksprimiranjem gena *syn2a*, što dalje utiče na stvaranje sinapsi, otpuštanje neurotransmitera i neuralnu diferencijaciju (Liu i sar., 2018).

Neurogenin 1 (Ngn1) je heliks-petlja-heliks transkripcioni faktor koji se eksprimira u proliferirajućim progenitorskim ćelijama tokom inicijacije neuronske diferencijacije i igra ključnu ulogu u usmeravanju neurogeneze. Koristi se kao marker razvoja velikog mozga. Kod zebrica je prisutan u jednoj kopiji, dok kod ostalih kičmenjaka postoje dva gena za neurogenin (Andermann i sar., 2002). Ngn1 i Ngn2 transkripti su eksprimirani u različitim podskupovima plakoda, a i šema eksprimiranja se razlikuje od organizma do organizma (Abu-Elmagd i sar., 2001; Schlosser i Northcutt 2000; Sommer i sar., 1996). Kod ribe zebrice pokazano je da su transkripti Ngn1 eksprimirani kod 10 hpf embriona u neuralnoj ploči i da se do 24 hpf njihovo eksprimiranje proširilo na mnoge druge regione u mozgu embriona (Blader i sar., 1997; Blader i sar., 2003). Eksprimiranje gena *ngn1* je neophodno za formiranje svih senzornih ganglija, dok razvoj senzornih neuromasta ne zavisi od *ngn1*, što sugerise da su ova dva događaja pod različitom genskom kontrolom (Andermann i sar., 2002). Ciljana inaktivacija *ngn1* dovodi do gubitka ganglija izvedenih iz trigeminalnog plakoda, ušnog plakoda i nervnog grebena (Ma i sar., 1998). Transkripti *syn2a* i mijelinskog baznog proteina povećani su tokom razvoja, dok su Ngn1, α -tubulin i glijalni fibrilarni kiselinski proteini u početku povećani, ali zatim su u padu. Nakon tretmana sa etanolom, poraslo je eksprimiranje *ngn1*, dok je *syn2a* ostalo neporomenjeno (Fan i sar., 2010).

Emx je familija transkripcionih faktora sa homeodomenom koju čine dva člana, Emx1 i Emx2, koji predstavljaju markere razvoja velikog mozga. I kod riba zebrica je pokazano eksprimiranje *emx1* i *emx2* u prednjem mozgu (Morita i sar., 1995). Poređenje sekvenci proteina EMX1 između čoveka, miša, žaba i riba zebrica pokazalo je značajno odstupanje sekvence između zebrice i drugih kičmenjaka (Patarnello i sar., 1997). Ipak, kasnija istraživanja su pokazala da je gen *emx1* kod zebrica ortolog istom genu kod drugih kičmenjaka (Kawahara i Dawid, 2002). Emx1 kod zebrica iskazuje dinamičko

ekspimiranje tokom razvoja i ima dva glavna domena ekspimiranja, mezoderm i prednji mozak. *Emx1* se inicijalno ekspimirira u širokom domenu pronefričnog mezoderma, a zatim u urogenitalnom otvoru. U mozgu kod 24 hpf embriona riba zebrica, *emx1* se detektuje u velikom mozgu, epifizi, olfaktornoj plakodi i populaciji malih ćelija u prednjem mozgu (Kawahara i Dawid, 2002).

Pax (engl. *paired box*) je familija transkripcionih faktora sa uparenim domenom koju kod sisara čine do sada poznatih devet članova (*PAX1-9*), a poznato je i postojanje ortologa kod drugih životinjskih vrsta (Chi i Epstein, 2002). Zebrice imaju gene *pax2a* i *pax2b* koji se ekspimiraju u ušnom regionu (Pfeffer i sar., 1998). Pokazana je njihova funkcija, zajedno sa *pax8*, u regulaciji puteva koji učestvuju u indukciji stvaranja ušne plakode. Ometanje funkcija *Pax2a* i *Pax8* blokira razvoj uha zebrica (Hans i sar., 2004). Geni *Pax2-Pax5-Pax8* imaju važnu ulogu u embrionalnom razvoju i organogenezi oka, uha, bubrega i štitne žlezde kod miševa (Dressler i sar., 1990; Nornes i sar., 1990; Plachov i sar., 1990). Kod riba zebrica gubitak ekspimiranja *pax2a* dovodi do neuspelog formiranja suženja (engl. *isthmus*) između srednjeg i zadnjeg mozga (Brand i sar., 1996; Lun i Brand, 1998).

Otx2 (engl. *orthodenticle homeobox 2*) je transkripcioni faktor sa homeo domenom i koristi se kao marker razvoja prednjeg mozga, srednjeg mozga i razvoja očiju i srodnih struktura. Ekspimirira se kod 9 hpf embriona riba zebrica, najviše u leđnom delu iza očnih vezikula (Li i sar., 2015).

Sox (engl. *SRY-related HMG-box*) je familija transkripcionih faktora koji imaju veliki broj važnih uloga tokom razvoja i konzervirani su među vrstama (Kamachi i Kondoh, 2013). Kod zebrica je okarakterisano nekoliko članova SoxB1 familije: Sox1 (a/b), 2, 3 i 19 (a/b) i svi su indukovani tokom faze blastule i neophodni su da bi se odredila sudbina neuralnog ektoderma (Dee i sar., 2008; Okuda i sar., 2010). Sox2 je jedan od najvažnijih faktora potrebnih za održavanje neuralnih progenitorskih svojstava i njihovih funkcija kod kičmenjaka (Bani-Yaghoub i sar., 2006; Favaro i sar., 2009; Taranova i sar., 2006). Gen *sox2* se ekspimirira i u neuralnim progenitorima u embrionu, kao i u neuralnim matičnim ćelijama mozga odraslih riba zebrica (Kaslin i sar., 2009; Lam i sar., 2009; Marz i sar., 2010; Okuda i sar., 2010). U optičkom tektumu odrasle zebrice proliferišuće ćelije ekspimiraju neuronske progenitorske markere među kojima

je i Sox2 (Bravo i Macdonald-Bravo, 1987; Ferri i sar., 2004; Kaneko i sar., 2000). Ekspimiranje gena *sox3* zavisi od signalnog puta Fgf u blastodermu (Rentzsch i sar., 2004) i reguliše ekspimiranje morfogenetskog proteina kostiju (engl. *bone morphogenetic protein*, BMP) 2 i 7 (Okuda i sar., 2010).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Razvoj višćelijskog organizma od jedne ćelije predstavlja vrlo složen proces koji se karakteriše kontrolom različitih funkcija od proliferacije, migracije, diferencijacije do formiranja organa i tkiva. Razumevanje molekularnih mehanizama koji kontrolišu pojedine razvojne procese predstavlja značajan segment koji je kritičan za bolje sagledavanje samog procesa embriogeneze, ali i za upoznavanje razvojnih poremećaja nastalih zbog narušene aktivnosti signalnih puteva.

U ovoj disertaciji ispitivana je uloga pojedinih puteva na eksprimiranje enzima koji su uključeni u metabolizam ksenobiotika i u regulaciju redoks ravnoteže embriona kao i na rast i razvoj embriona. Zbog svega navedenog, u okviru ove disertacije, definisani su sledeći ciljevi istraživanja:

- Ispitati uloge kinaza Erk i Akt na eksprimiranje gena za enzime I i II faze metabolizma ksenobiotika kao i gena za antioksidativne enzime tokom ranog razvoja embriona. U tu svrhu analiziraće se nivo transkripcije gena *gstp1-2*, *gstal-3*, *gstm1-3*, *cyp1a*, *cyp3a65*, *hmox*, *cat*, *sod2* i *gpx1* u bazalnim uslovima i nakon primene inhibitora Erk i Akt.
- Ispitati ulogu kinaza Erk i Akt na eksprimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrića tokom oksidativnog stresa. Analiziraće se nivo transkripcije gena *gstp1-2* nakon primene tBHQ i PMA, dve supstance koji indukuju oksidativni stres. Za definisanje uloge signalnih puteva Erk i Akt na eksprimiranje gena *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa ispitivaće se aktivnost Erk i Akt kao i efekat inhibicije aktivnosti ovih kinaza na nivo eksprimiranja *gstp1-2* kod embriona riba zebrića tretiranih sa tBHQ i PMA.
- Ispitati ulogu cAMP/Pka/Creb signalizacije na eksprimiranje *gstp1-2* kod embriona riba zebrića. Prvo će se analizirati eksprimiranje *gstp1-2* kod embriona tretiranih sa forskolinom, stimulatorom signalnog puta cAMP/Pka/Creb. Za bliže definisanje uloge cAMP/Pka/Creb i povezanosti sa kinazom Erk pratiće se aktivnost proteina Creb kod embriona riba zebrića u uslovima aktivacije i inhibicije kinaze Erk.

- Ispitati ulogu signalnog puta Pkc tokom ranog razvoja embriona riba zebrica. Analiziraće se rani razvoj embriona riba zebrica nakon tretmana sa PMA, supstance koja aktivira signalni put Pkc. Pratiće se stopa preživljavanja, pojava deformiteta i apoptoza kod embriona riba zebrica. Za definisanje uloge signalnog puta Pkc tokom rane embriogeneze pratiće se efekat inhibicije aktivnosti kinaze Pkc na preživljavanje, pojavu deformiteta i apoptozu kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA.

3. MATERIЈAL I METODE

Svi ogledi su izvođeni u Laboratoriji za ekotoksikologiju, Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Rad je podržan sredstvima projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj projekta: OI173037) i SCOPES projekta Švajcarske nacionalne fondacije za nauku (broj projekta: SCOPES IZ73Z0_128025). U doktorskoj disertaciji korišćeni su embrioni riba zebrica koji su obezbeđeni u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Prema Zakonu o dobrobiti životinja Republike Srbije (Sl. glasnik Republike Srbije br. 41/09), odnosno Pravilniku o uslovima za upis u Registar za ogledne na životinjama i sadržini i načinu vođenja tog registra, programu obuke o dobrobiti oglednih životinja, načinu nege, postupanja i lišavanja života oglednih životinja, obrascu zahteva za odobrenje sprovođenja ogleda na životinjama, načinu nege, postupanja i lišavanja života oglednih životinja, kao i o sadržini i načinu vođenja evidencije o držanju, reprodukciji, prometu, odnosno sprovođenju ogleda na životinjama (Sl. glasnik Republike Srbije br. 39/10), stoji da se za ogledne na jajima, embrionima, larvama riba ne podnose zahtevi za izdavanje rešenja o odobrenju sprovođenja ogleda. Naime, jaja, embrioni i larve riba nisu obuhvaćeni važećom Direktivom Evropske Unije o zaštiti životinja koje se koriste u naučnoistraživačke svrhe, a do 120 hpf se smatraju *in vitro* modelom obzirom da nemaju spoljašnju ishranu (EEC, 1986; EEC, 2010).

3.1. Hemikalije

PMA, tBHQ, PD98059 (2-(2-Amino-3-methoksifenil)-4H-1-benzopiran-4-1), NAC (N-acetil cistein), U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)-butadien), vortmanin (engl. *Wortmannin*, Vort), forskolin (Fors), kao i dimetilsulfoksid (DMSO) su nabavljeni od Sigma Chemical Company (Stajnhajm, Nemačka). Bisindolilmaleimid I (GF 109203X, GFX) je nabavljen od Calbiochem (La Jola, Kalifornija, SAD). Za izolaciju totalne RNK je korišćen Trizol reagens nabavljen od Invitrogen (Karlsbad, Kalifornija, SAD), hloroform i izopropanol nabavljeni od Lach-ner (Neratovice, Češka), apsolutni etanol nabavljen od Zorka, Šabac, voda oslobođena od nukleaza tretiranjem sa

dietilpirokarbonatom (engl. *diethyl pyrocarbonate*, DEPC) nabavljena od Invitrogen (Karlsbad, Kalifornija, SAD).

Komplet za sintezu komplementarne DNK (engl. *complementary DNA*, kDNK) sa inhibitorom ribonukleaza (engl. *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor*) i komplet za lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (engl. *Power SYBR Green PCR Master Mix*) su nabavljeni od Applied Biosystems (Foster Siti, Kalifornija, SAD). Komplet za klasičnu lančanu reakciju polimeraze (*Platinum Blue PCR SuperMix*), prajmeri za oba metode lančane reakcije polimeraze i *TrackIt DNA Ladder* marker za agaroznu gel elektroforezu su nabavljeni od Invitrogen (Karlsbad, Kalifornija, SAD).

Opšte hemikalije koje se koriste za pripremu pufera i gelova (agarozna, etidijum bromid-EtBr, TWEEN® 20, Nonidet™ P 40 (NP-40), natrijum deoksiholat (engl. *sodium deoxycholate*), amonijum persulfat, akrilamid/bis-akrilamid, N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED), β-merkaptoetanol, natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), glicin, TRIZMA base, ditiotretitol (DTT), goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA, frakcija V), boja za pripremu proteina, inhibitori fosfataza i proteaza kupljeni su od Sigma Chemical Company (Stajnhajm, Nemačka). Komplet za određivanje koncentracije proteina *Pierce BCA*, hemiluminiscentni supstrat *SuperSignal West Femto* i Proteinski marker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* kupljen je od Thermo Scientific (Rokford, Illinois, SAD), dok su komplet za određivanje koncentracije proteina *Dc* i proteinski marker *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™* nabavljeni od Bio-Rad (Herkjuliz, Kalifornija, SAD). Poliviniliden difluorid (PVDF) membrana je nabavljena od proizvođača Milipore (Bilerika, Masačusets, SAD). Poliklonska zečja antitela za fosfo-Erk1/2 i Akt, i monoklonska zečja antitela za fosfo-Akt, fosfo-Creb i Gapdh (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) nabavljena su od Cell Signaling Technology (Denvers, Masačusets, SAD). Poliklonsko zečje antitelo za Erk je nabavljeno od Santa Cruz Biotechnology (Dalas, Teksas, SAD). Kozje anti-zečije sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) nabavljeno je od Bio-Rad (Herkjuliz, Kalifornija, SAD).

Akridin oranž (engl. *acridine orange*, AO) boja je nabavljena od AppliChem GmbH (Darmstadt, Nemačka). Trikain (etil 3-aminobenzoat metanesulfonat, MS-222),

metilceluloza i HEPES su nabavljeni od Sigma Chemical Company (Stajnhajm, Nemačka). Ostale hemikalije su bile analitičke čistoće.

3.2. Model organizam – embrioni ribe zebrice

U eksperimentalnom radu korišćeni su embrioni riba zebrica koji su dobijeni u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, u definisanim uslovima prema OECD protokolu (poglavlje 3.2.1. Gajilište; OECD, 2013).

3.2.1. Gajilište

U prostoriji je obezbeđen automatizovan sistem za uspostavljanje odgovarajućeg svetlosnog režima (12 h svetlost – 12 h mrak) i održavanja konstantne temperature u prostoriji ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$). Kvalitet vode u akvarijumima konstantno je održavan u opsegu sledećih vrednosti: pH 8,4, zasićenost kiseonikom 80% i temperatura $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ pomoću filtriranja i cirkulisanja vode upotrebom spoljašnjih filter-kanistera, sistema za aeraciju i akvarijumskih grejača. Održavanje akvarijuma podrazumeva pranje filtera na mesečnom nivou i nedeljnu izmenu 1/3 akvarijumske vode prethodno pripremljenom vodom. Priprema vode podrazumeva mešanje vode iz česme sa komercijalno dostupnim sredstvima za pripremu i obogaćivanje vode (Easy-Life Filtermedium, Duiven, Holandija) u vidu minerala u odgovarajućim količinama na osnovu prethodne analize vode iz česme. Tokom procesa pripreme voda je čuvana na temperaturi od $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, uz zasićenost kiseonikom (80%) što se postiže upotrebom sistema za aeraciju i grejača, najmanje 48 h pre izmene vode. Na dnu akvarijuma je postavljena podloga od ekspanzirane gline, kako bi se napravila odgovarajuća prisutnost dobrih bakterija u porama gline.

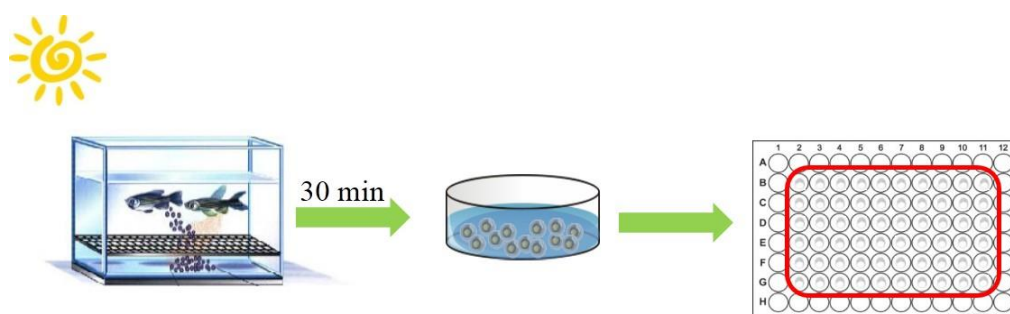
3.2.2. Embrioni ribe zebrice

Adultne jedinke zebrica (AB soj) su velikodušan poklon od dr Žolta Čenkija (mađ. Zsolt Csenki), Univerzitet Sent Ištvan, Gedele, Mađarska. Ženke i mužjaci su držani u

zasebnim akvarijumima (~100 L) kako bi parenje bilo kontrolisano. U akvarijumima je obezbeđen minimum 1 L vode po jedinki. Za ishranu polno zrelih jedinki korišćene su žive artemije, *Artemia nauplii* (Sanders, Južni Ogden, Juta, SAD) koje su pripremane u gajilištu iz liofiliziranih jaja ovih rakova i komercijalno dostupna ljustasta hrana za akvarijumske ribice (Tropical D-vital plus, Korzuv, Poljska). Hranjene je vršeno redovno 2 puta dnevno (9 h i 15 h), 6 dana u nedelji.

3.2.3. Parenje zebrica i selekcija oplodjenih embriona

U cilju prikupljanja embriona riba zebrica za potrebe eksperimenata, akvarijumi su posebno pripremani nekoliko dana pre parenja. Akvarijumi za parenje su manje zapremine (~30 L) sa mrežicom na dnu kako bi se sprečio kanibalizam nakon izbacivanja jajnih ćelija i njihovog oplodjenja. Takođe, na sredini mrežice se stavlja veštačka trava kako bi se obezbedila pogodna sredina za parenje. Voda u akvarijumima za parenje predstavlja mešavinu 2/3 pripremljene vode i 1/3 destilovane vode, a aeracija i temperatura se održavaju na isti način kao i u ostalim akvarijumima. Veće pre planiranog parenja se u ovako pripremljene akvarijume stavlja 5 ženki i 10-15 mužjaka preko noći. Paljenje svetla u jutarnjim satima (8:30) stimuliše parenje. Ribice se pare tokom perioda od 30 min nakon čega se prikupljaju embrioni i pristupa se selekciji zdravih embriona koji će se dalje koristiti u eksperimentu (Slika 3.1) (Kimmel i sar., 1995; OECD, 2013; Glisic i sar., 2016).



Slika 3.1. Parenje riba zebrica, selekcija oplodjenih embriona i postavka embriona u bunarčice ploče. Parenje otpočinje sa pojavom svetlosti u jutarnjim satima. Nakon 30 min se prikupljaju embrioni i nakon selekcije oplodjenih i zdravih embriona pod mikroskopom, embrioni se prebacuju u ploče sa 96 bunarčića, 1 embrion/200 μ L/bunarčiću.

3.3. Tretmani

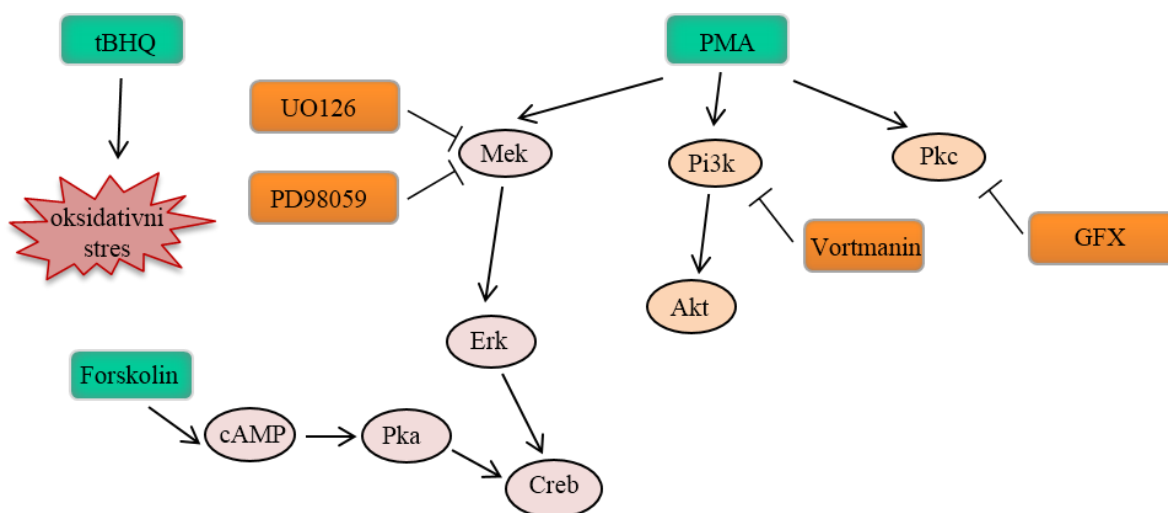
Embrioni su tretirani u pločama sa 96 bunarčića, a u svaki bunarčić je stavljan jedan embrion u 200 μ L rekonstituisane vode (ultra čista voda obogaćena sa: 2 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgSO_4 , 0,75 mM NaHCO_3 i 0,075 mM KCl) sa odgovarajućim tretmanom. Ploče su zatvarane sa odgovarajućim poklopcima, a tokom inkubacije ploče sa embrionima su bile u inkubatoru sa kontrolisanom temperaturom i svetlošću kao i kod odraslih jedinki riba zebrica (26 ± 1 °C, 12 h svetlost – 12 h mrak). Osnovni rastvori svih hemikalija pravljani su u DMSO. Radni rastvori hemikalija su pripremani u rekonstituisanoj vodi, pri čemu krajnja koncentracija DMSO nije prelazila 0,03%. Određivanje starosti i stadijuma embriona je vršeno prema dostupnim literaturnim podacima (Kimmel i sar., 1995) (Tabela 3.1). Beležena je smrtnost embriona tokom svakog posmatranja, a koagulirani embrioni su uklanjani. Tokom svih ispitivanja nepravilan razvoj embriona je zabeležen kod manje od 15% embriona.

Tabela 3.1. Stadijumi razvoja riba zebrica. Do 120 hpf usled nedostatka spoljašnje ishrane embrioni riba zebrica se smatraju *in vitro* model organizmom. Preuzeto uz izmene sa <https://zfin.org/>.

Stadijum	Faza	Trajanje
Zigot	1 ćelija	0 - 0,75 h
Deoba	2 - 64 ćelije	0,75 - 2,25 h
Blastula	128 ćelija - 30% epibola	2,25 - 5,25 h
Gastrula	50% epibola - začetak (bud)	5,25 - 10,33 h
Segmentacija	1 - 26+ somita	10,33 - 24 h
Faringula	pojava osnove grudnog peraja	24 - 48 h
Izleganje	razvoj grudnog peraja	48 - 72 h
Larva	otvaranje usta	72 - 120 h
Larva		120 h - 29 d
Juvenilni		30 - 89 d
Adult		90 d - 2 god

Za ispitivanje uloge različitih signalnih puteva na ekspimiranje gena uključenih u redoks regulaciju, metabolizam ksenobiotika i razvoj, embrioni riba zebrica su izlagani U0126 i PD98059, farmakološkim inhibitorima Erk; vortmaninu, farmakološkom

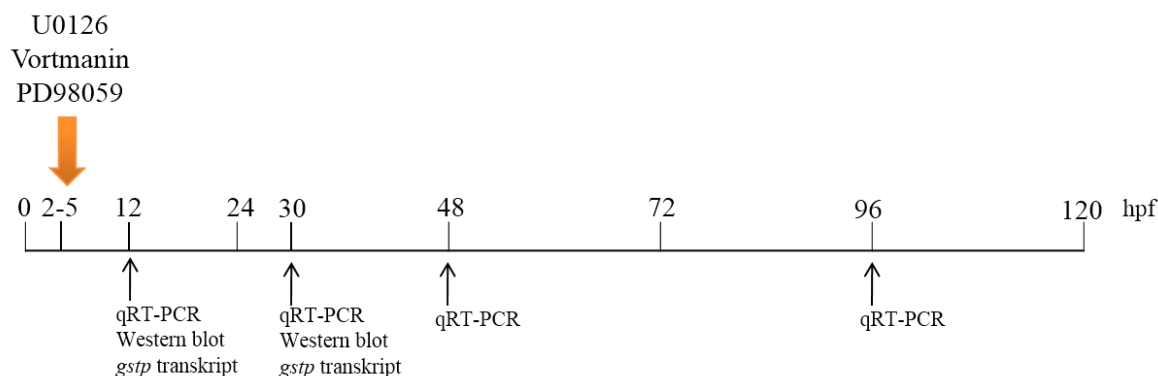
inhibitoru Pkb/Akt; GFX, farmakološkom inhibitoru Pkc. Za indukciju signalnih puteva embrioni su izlagani forskolinu, aktivatoru signalnog puta cAMP/Pka/Creb i PMA, aktivatoru signalnog puta Pkc. Indukcija oksidativnog stresa kod embriona riba zebrica je izazvana dodatkom tBHQ ili PMA. Mesta delovanja inhibitora i stimulatora signalnih puteva su prikazana na slici 3.2. Koncentracije U0126, vortmanina, forskolina, GFX i PMA su izabrane na osnovu literaturih podataka (Hawkins i sar., 2008; Hong i sar., 2006; Hermann i sar., 2004; Yoshida i sar., 2002; Timme-Laragy i sar., 2009).



Slika 3.2. Šematski prikaz mesta delovanja inhibitora i stimulatora signalnih puteva.

3.4. Eksperimentalni dizajn 1

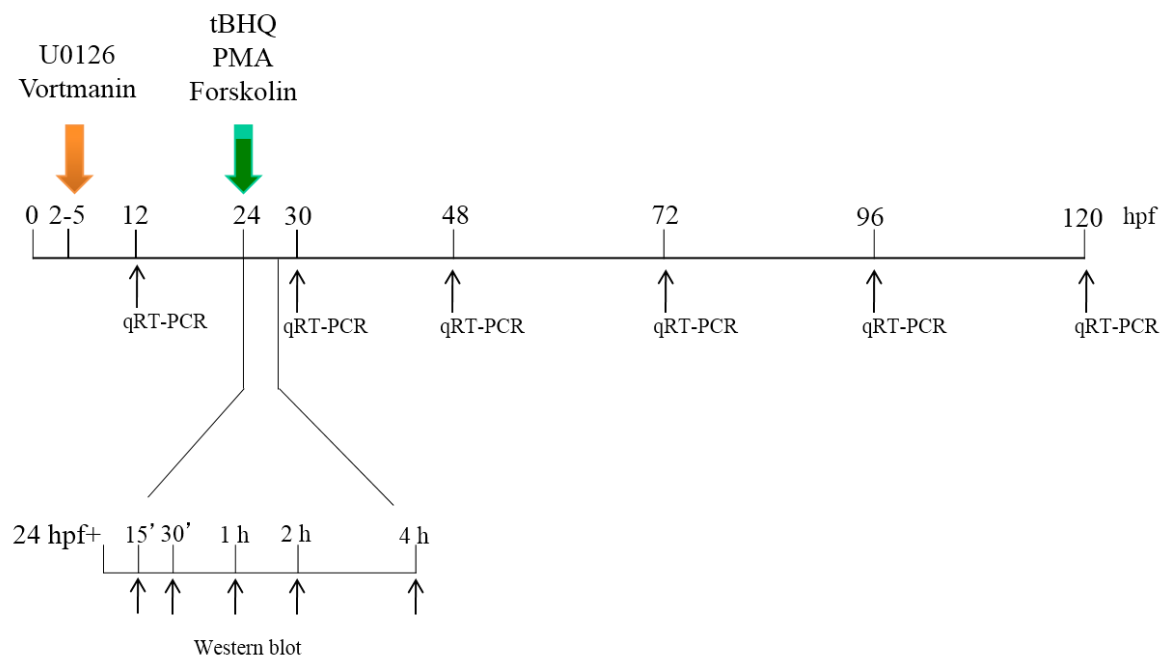
U0126 (10 μ M i 100 μ M), vortmanin (1 μ M), PD98059 (25 i 50 μ M) su dodani dok su embrioni bili u stadijumu blastule (2 hpf) ili gastrule (5 hpf), a embrioni su sakupljeni (5-15 embriona/grupi) u sledećim stadijumima: segmentacija (12 hpf), faringula (30 hpf), izleganje (48 hpf), larva (96 hpf). Nakon sakupljanja, embrioni su posmatrani pod mikroskopom i oni koji su se normalno razvili do posmatranog stadijuma su uzeti za analizu ekspimiranja gena uključenih u metabolizam ksenobiotika i odgovor na oksidativni stres i kvantifikaciju fosforilisane i nefosforilisane forme ispitivanih proteina (Erk, Akt). Šema eksperimentalnog dizajna je data na slici 3.3.



Slika 3.3. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna 1. Embrioni tokom stadijuma blastule (2 hpf) ili gastrule (5 hpf) su tretirani sa inhibitorima: U0126 (10 μ M i 100 μ M), vortmaninom (1 μ M), PD98059 (25 i 50 μ M). Embrioni su sakupljeni za analizu ekspimiranja gena (12, 30, 48 i 96 hpf), analizu transkripta *gstp* (12 i 30 hpf) i analizu pErk i pAkt (12 i 30 hpf).

3.5. Eksperimentalni dizajn 2

Embrioni riba zebrica u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa različitim koncentracijama tBHQ (0; 2,5; 5; 10; 30 μ M) u trajanju od 6, 24, 48, 72 i 96 h, PMA (200 μ g/L) u trajanju od 24 h ili forskolina (50 μ M) u trajanju od 6 h. Nakon tretmana, normalno razvijeni embrioni su sakupljeni za analizu ekspimiranja gena *gstp1-2*. Pojedine grupe embriona su tretirane sa U0126 (10 μ M) ili vortmaninom (1 μ M) u stadijumu gastrule (5 hpf), a nakon toga je dodat tBHQ (10 μ M), PMA (200 μ g/L) ili forskolin (50 μ M) u stadijumu faringule (24 hpf). Embrioni su posmatrani pod mikroskopom u stadijumu segmentacije (30 hpf) i izleganja (48 hpf) i oni koji su se normalno razvili do posmatranog stadijuma su sakupljeni za analizu ekspimiranja *gstp1-2* i *nrf2a* i za aktivaciju Erk i Akt. Šema eksperimentalnog dizajna je data na slici (Slika 3.4).

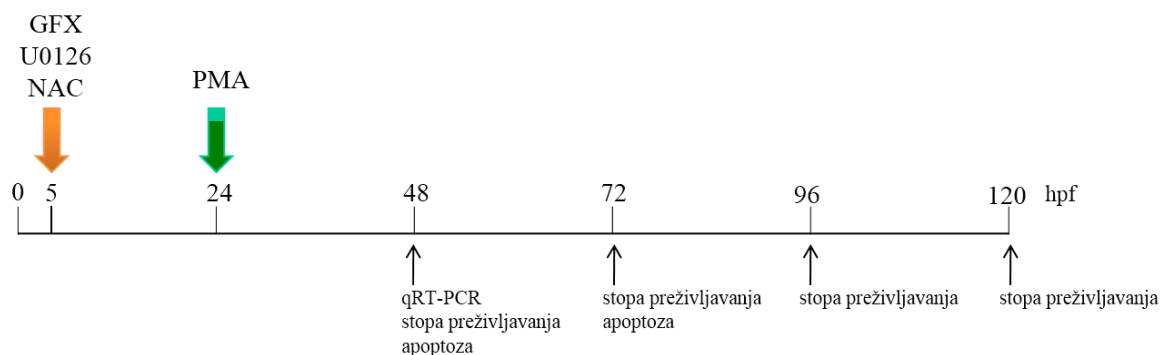


Slika 3.4. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna 2. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa različitim koncentracijama tBHQ (0, 2,5, 5, 10 i 30 μM), PMA (200 $\mu\text{g/L}$) i forskolinom (50 μM) i zatim sakupljeni za analizu ekspimiranja gena u nekoliko vremenskih tačaka (30, 48, 72, 96 i 120 hpf). Embrioni tokom stadijuma gastrule (5 hpf) su tretirani sa inhibitorima U0126 (10 μM) i vortmaninom (1 μM) nakon čega su u stadijumu faringule (24 hpf) tretirani sa tBHQ (10 μM), PMA (200 $\mu\text{g/L}$) i forskolinom (50 μM). Embrioni su zatim sakupljeni za analizu ekspimiranja gena u nekoliko vremenskih tačaka (12, 30, 48, 72, 96 i 120 hpf). Za analizu pErk, pAkt i pCREB embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa tBHQ (10 μM) ili PMA (200 $\mu\text{g/L}$) ili forskolinom (50 μM), a metoda Western blot je rađena u nekoliko vremenskih tačaka nakon tretmana (0,25; 0,5; 1; 2 i 4 h).

3.6. Eksperimentalni dizajn 3

Za ispitivanje efekta Pkc, embrioni riba zebrica su tretirani sa PMA u koncentracijama od 10, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$ od stadijuma faringule (24 hpf) do larvalnog stadijuma (120 hpf). Razvojne karakteristike su beležene svaka 24 h. U cilju bližeg definisanja uloge Pkc, neke od eksperimentalnih grupa su najpre tretirane sa odabranim farmakološkim inhibitorima u stadijumu gastrule (5 hpf): GFX (20 μM), U0126 (10 μM) i NAC (50 μM), nakon čega je sledio tretman sa PMA (200 $\mu\text{g/L}$) u stadijumu faringule (24 hpf). Embrioni riba zebrica su sakupljeni nakon 24 sata inkubacije sa PMA (tokom izleganja, 48 hpf) za analizu ekspimiranja gena (5 embriona/grupi) i za praćenje apoptoze (10 embriona/grupi). Beleženje morfoloških karakteristika i deformiteta je prethodilo

ostalim analizama. Analizirane su promene u eksprimiranju gena uključenih u apoptozu, razvoj mozga i odgovor na oksidativni stres. Šema eksperimentalnog dizajna je data na slici 3.5.



Slika 3.5. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna 3. Embrioni su tretirani sa GFX (20 μM), U0126 (10 μM) i NAC (50 μM) u stadijumu gastrule (5 hpf), nakon čega je sledio tretman sa PMA (200 $\mu\text{g/L}$) u stadijumu faringule (24 hpf). Embrioni su sakupljeni za analizu eksprimiranja gena u stadijumu izleganja (48 hpf), apoptoze u stadijumu izleganja (48 hpf) i stadijumu larve (72 hpf). U nekoliko vremenskih tačaka su beleženi podaci o pojavi deformiteta i smrtnosti embriona (48, 72, 96 i 120 hpf).

3.7. Analiza eksprimiranja gena

3.7.1. Izolacija totalne RNK i reverzna transkripcija

Izolacija ukupne RNK iz embriona rađena je upotrebom TRIzol reagensa (Sigma Aldrich). Embrioni su sakupljeni u tubice oslobođene od nukleaza, lizirani i homogenizovani u trizolu (5-10 embriona/200 μL trizola) pomoću odgovarajućeg homogenizera. Zatim je dodata 1/5 zapremine (40 μL) hloroforma (Zorka, Šabac) na homogenat u cilju razdvajanja tečne i organske faze. Nakon centrifugiranja (12000 x $g/20$ min/4 $^{\circ}\text{C}$) gornja faza, odnosno faza u kojoj se nalazi RNK, je prebačena u novu tubicu i precipitirana je dodavanjem jednake količine (~100 μL) izopropanola (Lachner, Neratovice, Češka) i centrifugiranjem (12000 x $g/10$ min/4 $^{\circ}\text{C}$). Zatim se talog ispira sa 75% etanolom (Zorka, Šabac; 200 μL) koji se odstranjuje dekantovanjem nakon centrifugiranja (12000 x $g/10$ min/4 $^{\circ}\text{C}$). Nakon isparavanja alkohola, RNK se rastvara u 12 μL vode tretirane sa DEPC (engl. *DEPC-treated H₂O*). Nakon inkubiranja

(5 minuta na 60 °C), određivana je koncentracija i čistoća ukupne RNK na BioSpec-nano spektrofotometru (Schimadzu Corporation, Kyoto, Japan) u 1 µL uzorka merenjem absorbance u UV spektru (230, 260 i 280 nm). Prosečan prinos ukupne RNK izolovane iz embriona bio je u opsegu 100-200 ng/µL, dok su odnosi apsorbanci koji ukazuje na kontaminaciju proteinima (A260/A280) i organskim materijama (A260/A230) bili u zadovoljavajućem rangu (1,9-2,1). RNK je prevođena u komplementarnu DNK (kDNK) u reakciji reverzne transkripcije. Za ovaj postupak korišćen je komplet „*High-Capacity cDNA reverse transcription*“ prema uputstvu proizvođača. U lančanu reakciju polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je stavljano maksimalno 2 µg totalne RNK i komponente master miksa (deoksinukleotid trifosfati, opšti prajmeri, reverzna transkriptaza, pufer, voda, inhibitor RNaza). Protokol rada *Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler* aparata obuhvatao je sledeće korake: 10 min na 25 °C, 120 min na 37 °C, 20 min na 85 °C i na kraju aparat spušta temperaturu na 4 °C i održava je neograničeno kako bi se zadržao kvalitet i integritet kDNK. Dobijena kDNK čuvana je u zamrzivaču na -20 °C do daljeg korišćenja.

3.7.2. Relativna kvantifikacija eksprimiranja gena

Relativna kvantifikacija eksprimiranja gena je urađena analizom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) korišćenjem SYBR Green tehnologije. Korišćen je komplet koji sadrži SYBR Green boju i sve ostale komponente neophodne za izvođenje analize izuzev matrice (DNK), prajmera i vode.

Reakciona smeša je sadržala 2,5 µL (12,5 ng) kDNK i 10 µL smeše, koju čine uzvodni (engl. *forward*, F) i nizvodni (engl. *reverse*, R) prajmeri (Tabela 3.2) u koncentraciji od 300 nM i Power SYBR Green PCR Master Mix.

Tabela 3.2. Prajmeri za metodu qRT-PCR.

Ciljni gen	Sekvence prajmera (u 5'-3' pravcu)	Dužina amplikona	Preuzeto/kod u GeneBank
<i>apaf1</i>	F: TTCTACAGTAAACGCCACC R: TATCTAGTATTTCCCATATTCC	205	Zhou i sar., 2015
<i>β-aktin</i>	F: CAACAGAGAGAAGATGACACAGATCA R: GTCACACCATCACCAGAGTCCATCAC	140	Timme-Laragy i sar., 2012
<i>bax</i>	F: GGCTATTTCAACCAGGGTTCC R: TGCGAATCACCAATGCTGT	197	Zhou i sar, 2015
<i>bcl-2</i>	F: TCACTCGTTCAGACCCTCAT R: ACGCTTTCACGCACAT	235	Zhou i sar, 2015
<i>caspase 3</i>	F: CCGTGCCCATCACTA R: ATCCTTTCACGACCATCT	129	NM_131877.3*
<i>caspase 9</i>	F: GATGGATGCCAGTCCGTGT R: GAGCCCTTGCGGTCATTTAG	87	Zhou i sar, 2015
<i>cat</i>	F: AGTGCTCCTGACGTCCAGCCA R: TGAAGAACGTGCGCACCTGGG	115	Brammell i Wigginton, 2010
<i>cyp1a</i>	F: ATTCATCCTTCCTTCCCTTCAC R: ACCTTCTCGCCTTCCAATTAT	210	Voelker i sar., 2008
<i>cyp3a65</i>	F: TCGGTGCGTACAGTATGGAT R: TCAGCAGGTCAAACCTCAGC	122	Glisic i sar., 2016
<i>ef1α</i>	F: CCTGGGAGTGAAACAGCTGATC R: GCTGACTTCCTTGGTGATTTCC	100	Popovic i sar., 2010
<i>emx1</i>	F: ACCGTCACGGACAATGTTCT R: GGTGCGGAATAGGGTCTT	106	NM_198144.2,*
<i>gapdh</i>	F: GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC R: GTGCAGGAGGCATTGCTTACA	173	McCurley i Callard, 2008
<i>gstp1-2</i>	F: CTACAACCTGTTCGATCTCCT R: GGGCAGAGATCTTGTCAC	101	Glisic i sar., 2015
<i>gstα1-3</i>	F: GAGGGTCTGATAGATCTGATG R: AACACTGGAAGGAAGCGCAC	119	Glisic i sar., 2015
<i>gstm1-3</i>	F: AATCAGGCGATGGACTTCC R: AGTCAGAGAACTGCTTTAGAG	115	Glisic i sar., 2015
<i>gpx1</i>	F: AGATGTCATTCCTGCACACG R: AAGGAGAAGCTTCCTCAGCC	94	Malek i sar., 2004
<i>hmox1</i>	F: GCTTCTGCTGTGCTCTCTATACG R: CTCTCAGTCTCTGTGCATATCG	215	Voelker i sar., 2008
<i>mdm2</i>	F: TCTTGGTGCGTGATTGGTG R: CCTACATCCGAGTTGCTGTTTG	80	Zhou i sar, 2015

Tabela 3.2. Prajmeri za metodu qRT-PCR (nastavak).

<i>ngn1</i>	F: ACAGACGCGTGCCATTATCT	84	NM_131041. 1*
	R: AACCTTATTGGTGGGCTGGG		
<i>nrf2a</i>	F: GAGCGGGAGAAATCACACAGAATG	82	Timme- Laragy i sar., 2012
	R: CAGGAGCTGCATGCACTCATCG		
<i>otx2</i>	F: GCTTCACGGTTTGAAGAAAAGG	109	NM_131251. 1*
	R: TCAAGCCGATGCCCGTAAA		
<i>p53</i>	F: GGGCAATCAGCGAGCAAA	197	Zhou i sar, 2015
	R: ACTGACCTTCTGAGTCTCCA		
<i>pax2a</i>	F: CCCACCTCTACACTTGCTGG	120	NM_131184. 2*
	R: ACTTAATAACGCGGGGTTGCT		
<i>puma</i>	F: TGGAAAGCAGAGTGGACGAA	108	Zhou i sar, 2015
	R: GATGGCAGGGCTGGATGA		
<i>sod2</i>	F: CGCATGTTCCCAGACATCTA	100	Brammell i Wigginton, 2010
	R: GAGCGGAAGATTGAGGATTG		
<i>sox2</i>	F: CTCATGGTGTGGTCGAGGG	132	NM_213118. 1*
	R: ATGAATGGTCGCTTCTCGCT		
<i>sox3</i>	F: GCCTACCCTCAACATCCCAG	108	NM_001001 811.2*
	R: CATGTAGGTCTGAGCCGTGG		
<i>syn2a</i>	F: CAGCAGGTTCTTCGGAGGAG	118	NM_001002 597.2*
	R: GGCTTTCTCCCCTCGACTTA		
<i>18s</i>	F: TCGCTAGTTGGCATCGTTTATG	-	(McCurley i Callard, 2008)
	R: CGGAGGTTCGAAGACGATCA		

* dizajniran u softveru *Primer express 3.0*

SYBR Green boja je korišćena za detekciju amplikona, dok je ROX korišćena kao internalna referentna boja. Svaki uzorak je rađen u duplikatu. Analize su rađene na *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-time PCR* sistemu (Applied Biosystems, Foster siti, SAD) prema odgovarajućem protokolu u SDS (engl. *sequence detection system*) programu verzija 2.3 u standardnim uslovima (50 °C/2 min, 95 °C/10 min; i 40 ciklusa, od kojih je svaki bio pri 95 °C/15 sekundi, a potom 60 °C/1 min).

Za obradu podataka odnosno izračunavanje Ct vrednosti korišćen je programski paket SDS RQ Manager, pri čemu je prag (eng. *threshold*) zadat automatski. Relativna kvantifikacija eksprimiranja gena vršena je komparativnom Ct metodom (Livak i Schmittgen, 2001), koja podrazumeva normalizaciju eksprimiranja ciljnog gena sa

endogenom kontrolom (ΔC_t), a zatim dalju normalizaciju sa kontrolnim uzorkom ($\Delta\Delta C_t$). Koeficijent relativnog eksprimiranja (R) ciljnog gena računat je na osnovu sledeće jednačine: $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.7.3. Analiza transkripata *gstp1* i *gstp2* metodom PCR

U cilju razlikovanja eksprimiranja gena klase *Gst Pi* korišćeni su specifični uzvodni (F, 400 nM) i nizvodni (R, 400 nM) prajmeri za *gstp1* i *gstp2* (Tabela 3.3), a u reakciju je stavljano 1, 20 ili 60 ng kDNK (Glisic i sar, 2015; Garner i Di Giulio, 2012). Za metodu PCR korišćen je komplet *Platinum Blue PCR SuperMix*. Analize su rađene na aparatu *Verity Thermal Cycler* (Thermo Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) prema odgovarajućem protokolu (94 °C/2 min; 35 ciklusa: 94 °C/30 sekundi, 58 °C/30 sekundi i 72 °C/1 min; 72 °C/10 min). Svi produkti PCR reakcije su razdvojeni na 1,5% agaroznom gelu sa EtBr pri naponu 150 V, u trajanju od 1,5 h. Trake na gelu su vizualizovane pomoću aparata *myECL imager* (Thermo Scientific, Illinois, SAD).

Tabela 3.3. Prajmeri za klasični PCR.

Ciljni gen	Sekvence prajmera (u 5'-3' pravcu)	Preuzeto iz:
<i>gstp1</i>	F: AAACGCACTTCACTCAGCGC	Glisic i sar., 2015
	R: TACCGACGTTGTCTAGTGTGA	
<i>gstp2</i>	F: ACCTCGCTTTTCACACAGTTC	Glisic i sar., 2015
	R: CGTTGTATCAACGTTCTGTTAAT	

3.8. Analiza proteina

3.8.1. Određivanje ukupne količine proteina u uzorcima

Nakon tretmana, embrioni su lizirani u RIPA puferu za liziranje (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% natrijum deoksiholat, 0,1% SDS; pH 7,4) sa dodatkom inhibitora proteaza (NaF; 1 mM) i inhibitora fosfataza (NaVO₄; 1 mM). Liziranje je vršeno u tubicama pomoću homogenizera (5 µL/1 embrionu). Lizati su sakupljeni i nakon centrifugiranja u supernatantu je fotometrijski određena količina proteina pomoću kompleta *DC* ili *Pierce BCA* prema uputstvu proizvođača. Izjednačene su koncentracije između različitih grupa uzoraka (1 mg/mL) i izvršena je priprema

uzorka sa 5x koncentrovanim puferom sa redukujućim agensima (25,5 mM EDTA, 416 mM SDS, 30% β -merkaptoetanol, 40% glicerol, 50 mM DTT, 62 mM Tris, 1,5 mM bromofenol plavo; pH 6,8). Nakon mešanja uzorka i pufera u odnosu 4:1, uzorci su inkubirani 5 min na 95 °C, nakon čega su ili nanošeni na gel za natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforezu (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) ili su čuvani na -20 °C do dalje analize.

3.8.2. SDS-PAGE i Western blot analiza

Detekcija i kvantifikacija fosforilisane forme proteina rađena je metodom Western blot. Najpre su proteini iz svih eksperimentalnih grupa razdvojeni pomoću SDS-PAGE elektroforeze u kontinuiranom puferskom sistemu, zatim su prenešeni na PVDF membranu metodom mokrog transfera (elektorblotting) i dalje inkubirani sa antitelima specifičnim za ciljni protein (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Karakterizacija antitela korišćenih za metodu Western blot.

Ciljni protein	Ime antitela, poreklo i tip	Proizvođač i kat.br.	Razblaženje	kDa
Primarna antitela:				
pErk	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) Rabbit polyAb	Cell Signaling, 9101	1:3000	44
pAkt	Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP Rabbit mAb	Cell Signaling, 4060s	1:1000	60
pCreb	Phospho-CREB (Ser133) (87G3) Rabbit mAb	Cell Signaling, 9198	1:1000	43
Gapdh	GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling, 2118	1:5000	37
tErk	ERK 2 (C-14) polyRabbitAb	Santa Cruz, SC-154	1:10000	42
tAkt	Akt Antibody Rabbit polyAb	Cell Signaling, 9272	1:5000	60
Sekundarno antitelo:				
	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	Bio-Rad, 1706515	1:3000	-

Za potrebe SDS-PAGE elektroforeze, pravljene su gelovi koji su imali deo za koncentrovanje uzoraka (3% gel akrilamid/bis-akrilamid) i separacioni deo (12% gel akrilamid/bis-akrilamid). Ukupno 30 µg proteina je razdvojeno pomoću jednodimenzionalne SDS-PAGE elektroforeze. Na svaki gel je nanošen proteinski marker poznatih molekularnih masa u rasponu 10-250 kDa. Elektroforeza je vršena u aparatu *Mini – PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad, Herkules, Kalifornija, SAD) na sobnoj temperaturi pri naponu od 120 V i trajanju od oko 90 min. Nakon završene elektroforeze vršen je prenos proteina sa gela na PVDF membranu mokrim transferom na +4° C, pri naponu 100 V, u trajanju od 2,5 h u aparatu *Mini-PROTEAN 3 Cell*. Nakon prenosa, membrane su blokirane u TBS puferu (10 mM *Tris base*, 100 mM NaCl, pH 7,4) koji je sadržao 0,1% Tween-20 i 3% BSA. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane sa primarnim antitelima za detekciju fosforilisanе forme Erk (engl. *phospho-Erk*; pErk), Akt (engl. *phospho-Akt*; pAkt), Creb (engl. *phospho-Creb*; pCreb) i ukupnog Akt (engl. *total Akt*, tAkt) u TBS/Tween puferu koji je sadržao 3% BSA, a za detekciju Gapdh i ukupnog Erk (engl. *total Erk*, tErk) u TBS/Tween puferu koji je sadržao 5% mleka, preko noći na +4 °C uz lagano mućkanje. Nakon inkubacije, membrane su isprane i dalje inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim sa enzimom HRP. Sekundarno antitelo je pripremano u puferu TBS/Tween koji je sadržao 3% BSA i rađena je inkubacija u trajanju 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije i ispiranja membrane, vršena je detekcija hemiluminiscentnog signala proteinskih traka korišćenjem hemiluminiscentnog supstrata *Supersignal West Femto*, u aparatu *myECL imager* (Thermo Scientific, Illinois, SAD). Analiza i kvantifikacija traka je urađena u programu *Image J* ili korišćenjem programskog paketa *myImage Analysis*. U svrhu detektovanja različitih proteina na istoj PVDF membrani, najpre su se uklanjala vezana antitela inkubacijom membrane u puferu za uklanjanje antitela (65 mM Tris-HCl, 20% SDS i 0,7% β-merkaptoetanol; pH 6,7) u trajanju od 30 min na 65°C. Nakon uklanjanja antitela i ispiranja membrana je ponovo blokirana i inkubirana sa primarnim antitelom za Gapdh.

3.9. Analiza promotora

Ova analiza je rađena kompjuterskom pretragom za potencijalnim vezujućim mestima transkripcionih faktora pomoću alatke *Genomatix MatInspector*, koja je dostupna online na *Genomatix Software Suite* (Minhen, Nemačka, <http://www.genomatix.de/>)

(Cartharius i sar., 2005). Ispitane su sekvence od 601 baznog para promotora *gstp1* i 614 baznog para promotora *gstp2*. Za obe pretrage, osnovna sličnost je postavljena na 75%, dok je sličnost matrice optimizovana.

3.10. Analiza morfologije embriona riba zebrica

Razvoj embriona, odnosno letalni efekti i različite morfološke promene koje se javljaju tokom razvića (razvoj tela, glave, očiju, repa, srca, cirkulacije, pigmentacije, deformiteta žumanceta, formiranje edema) su praćeni na svakih 24 h tokom 4 uzastopna dana tretmana pomoću lupe (Leica MZ16, Herbrug, Švajcarska) na uvećanju od 30x prema standardizovanom protokolu za ispitivanje hemikalija na ribama zebricama (OECD, 2013).

3.11. Analiza apoptoze kod embriona riba zebrica metodom akridin oranž

Akridin oranž je boja koja se umeće u nukleinske kiseline i emituje zelenu fluorescentnu boju kada je vezana za dvostruku DNK i selektivno boji apoptotične, a ne i nekrotične ćelije (Eimon i Ashkenazi, 2010). U cilju ispitivanja apoptoze, embrioni riba zebrica su inkubirani sa 2 mg/mL AO boje u trajanju od 30 min na 26 °C u mraku. Akridin oranž boja je razblažena do koncentracije od 2 mg/mL u puferu (50mM NaCl, 0,7 mM KCl, 0,4 mM MgSO₄, 0,6 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM HEPES; pH 7,4). Nakon bojenja, embrioni su ispirani i anestetizirani u 0,02% rastvoru MS-222 (MS-222 rastvoren u 20 mM Tris pufer; pH 7,4), uklonjen im je horion i postavljeni u 250 µL 3% metilceluloze rastvorene u PBS puferu na predmetnicu sa udubljenjem. Prisustvo apoptoze kod embriona je analizirano na fluorescentnom mikroskopu Olympus BX51 (Hamburg, Nemačka) na uvećanju od 40x (Liu i sar., 2014).

3.12. Statistička obrada podataka

Rezultati kvantifikacije eksprimiranja gena i fosforilacije proteina su izraženi u odnosu na odgovor dobijen u kontrolnoj grupi koji je definisan kao 1. Rezultati su prikazani grafički u formi stubića koji predstavljaju srednju vrednost sa prikazanom standardnom greškom srednje vrednosti (engl. *standard error of the mean*, SEM). Statistička analiza

vršena je pomoću programskog paketa Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jola, Kalifornija, SAD). Statistička značajnost je prvo utvrđena analizom varijanse (one-way ANOVA), a zatim je značajnost razlika između tretiranih grupa u odnosu na kontrolu utvrđena pomoću Danetovog (eng. *Dunnnett's*) ili Takijevog (eng. *Tukey's*) post-hoc testa. Studentski t-test je rađen gde je bilo primenjivo. Za sve statističke analize uzeta je ista granica verovatnoće, $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Optimizacija endogenih kontrola za metode qRT-PCR i Western blot

4.1.1. Optimizacija endogene kontrole za qRT-PCR

U cilju odabira gena koji će se koristiti kao endogena kontrola u reakciji qRT-PCR, embrioni riba zebrića su sakupljeni u bazalnim uslovima i nakon 24 h tretmana sa farmakološkim supstancama U0126 i/ili tBHQ u različitim vremenskim tačkama (4, 8, 24, 48, 72, 96 i 120 hpf). Analizirani su β -aktin, *gapdh*, *18s* i *ef1a*. Rezultati su pokazali da je ekspimiranje *gapdh* bilo najnestabilnije, dok je ekspimiranje *ef1a* i *18s* pokazuje ujednačenije Ct vrednosti u poređenju sa β -aktin i *gapdh* u bazalnim uslovima. Ekspimiranje *ef1a* je pokazalo bolju stabilnost u Ct vrednostima u poređenju sa *18s* nakon tretmana sa farmakološkim supstancama (Tabela 4.1). Za dalje analize ekspimiranja gena kao endogena kontrola korišćen je *ef1a*.

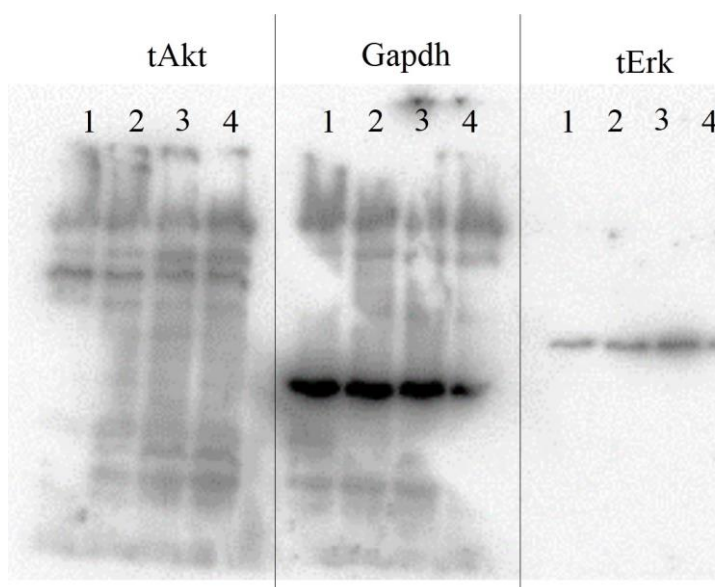
Tabela 4.1. Ct vrednosti endogenih kontrola u bazalnim i tretiranim uslovima.

Naziv gena	Ct vrednosti	Ct vrednosti
	(Bazalni uslovi)	(Tretmani)
<i>ef1a</i>	15,94 - 18,80	18,74 - 19,89
<i>18s</i>	16,37 - 18,02	19,23 - 22,41
β -aktin	15,81 - 20,26	19,71 - 23,72
<i>gapdh</i>	18,93 - 35,58	22,55 - 25,36

Takođe je ispitivano da li DMSO, rastvarač farmakoloških supstanci, utiče na ekspimiranje *ef1a*. Poređene su Ct vrednosti dobijene inkubiranjem embriona sa i bez 0,03% DMSO u trajanju od 24 h. Ct vrednost za ekspimiranje *ef1a* je iznosila 15,73, dok je u prisustvu 0,03% DMSO iznosila 15,93.

4.1.2. Optimizacija endogene kontrole za Western blot

U cilju odabira gena koji će se koristiti kao endogena kontrola u analizi proteina metodom Western blot, embrioni riba zebrića su tretirani sa tBHQ (10 μ M) u stadijumu blastule (2 hpf), u trajanju od 1, 2 i 4 h, odnosno u stadijumu faringule (24 hpf) u trajanju od 1 h. Nakon završetka inkubacije embrioni su sakupljeni za analizu sledećih proteina: total Erk (tErk), Gapdh i total Akt (tAkt) korišćenjem metode Western blot. Rezultati su pokazali da je Gapdh pokazao najintenzivniji signal, tErk je pokazao jasan ali slab signal, dok je signal za tAkt izostao (Slika 4.1). Za dalje analize ekspresije i aktivacije proteina metodom Western blot kao endogena kontrola je korišćen Gapdh.



Slika 4.1. Ekspresija tAkt, Gapdh i tErk kod embriona riba zebrića nakon tretmana sa tBHQ. Embrioni (15 embriona po grupi) su tretirani sa tBHQ (10 μ M) u stadijumu blastule (2 hpf) i faringule (24 hpf) po sledećim grupama: (1) 2 hpf + 1h, (2) 2 hpf + 2 h, (3) 2 hpf + 4 h, (4) 24 hpf + 1 h. Metodom Western blot su analizirani nivoi tAkt, Gapdh i tErk. Prikazana je reprezentativna slika dobijena metodom Western blot.

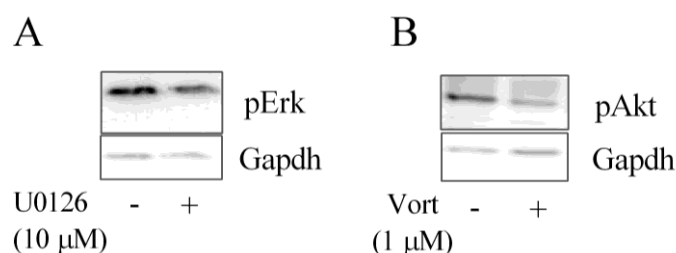
4.2. Uloga Erk i Akt na eksprimiranje izoformi Gst kod embriona riba zebrica

4.2.1. Ispitivanje efikasnosti i specifičnosti Erk i Akt inhibitora na embrione riba zebrica

U cilju ispitivanja uloge Erk i Akt u eksprimiranju izoformi Gst, prvo je testirana efikasnost inhibitora fosforilacije kinaza Erk (U0126 i PD98059), kao i inhibitora fosforilacije kinaze Akt (vortmanin, Vort) kod embriona riba zebrica. Specifičnost ova tri inhibitora je prethodno utvrđena na sisarskim ćelijama, a urađeno je i nekoliko istraživanja na ribama zebricama (Hawkins i sar., 2008; Hong i sar., 2006). Studije na ribama zebricama su pokazale da embrioni moraju biti duže izloženi U0126 (~18 h) kako bi došlo do ulaska dovoljne količine ovog inhibitora koja dovodi do efektivne inhibicije signala pErk (Hawkins i sar., 2008). Takođe je pokazano da koncentracija U0126 od 100 μM dovodi do morfoloških promena kod embriona, dok PD98059 pri dozi od 30 μM ili većim dovodi do embriotoksičnosti (Hawkins i sar., 2008).

Zbog pokazane toksičnosti, embrioni riba zebrica su bili izloženi U0126 (10 μM), vortmaninu (1 μM) i PD98059 (25 i 50 μM) u stadijumu gastrule (5 hpf). Tretman inhibitorima je trajao 25 h, odnosno do stadijuma faringule (30 hpf) kada su analizirani pErk i pAkt. Nakon završetka tretmana nisu uočeni deformiteti ili neki drugi znaci toksičnosti kod embriona riba zebrica. Stopa smrtnosti u kontrolnim grupama bila je između 0 i 10%, izuzev u eksperimentima u kojima su embrioni bili tretirani sa PD98059. Takođe, PD98059 u koncentracijama od 25 μM i 50 μM je pokazao toksičan efekat sa visokim procentom smrtnosti (68% - 25 μM , 78% - 50 μM) u prvih 10 h izlaganja ovom inhibitoru. Zbog visoke smrtnosti embriona riba zebrica nakon tretmana sa PD98059 ovaj inhibitor nije korišćenjem u daljim istraživanjima.

Analiza aktivnosti Erk i Akt je pokazala da tretman sa U0126 u trajanju od 25 h smanjuje pErk (Slika 4.2A), odnosno da tretman vortmaninom smanjuje pAkt (Slika 4.2B). Takođe, primećeno je da smanjenje aktivnosti Erk i Akt nije bilo potpuno nakon primene ovih inhibitora.



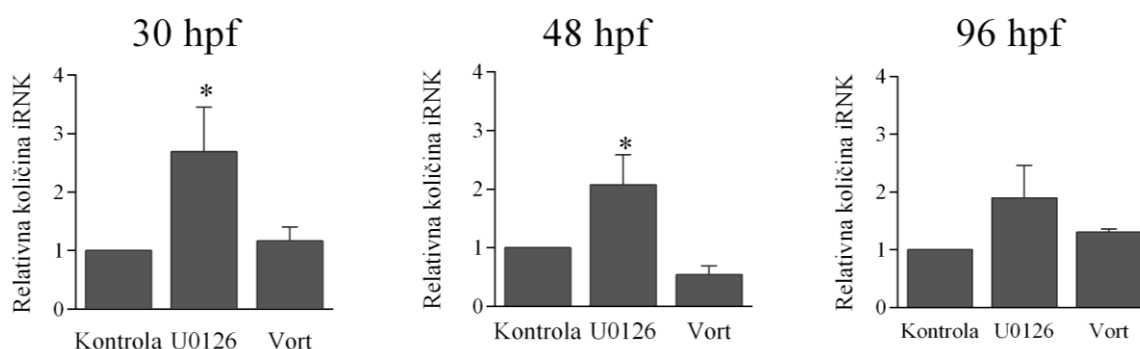
Slika 4.2. Efekat U0126 i vortmanina na fosforilaciju Erk i Akt kod embriona riba zebrica.

Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su tretirani sa U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M), a nivo aktivnosti (A) Erk i (B) Akt su analizirani u stadijumu faringule (30 hpf) metodom Western blot. U četiri nezavisna eksperimenta sa 5-10 embriona/grupi došlo je do smanjenja fosforilacije Erk i Akt. Prikazana je reprezentativna slika dobijena metodom Western blot.

4.2.2. Efekat inhibicije Erk i Akt na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrica

Nakon provera efikasnosti i specifičnosti inhibitora na aktivnosti Erk i Akt, dalje je ispitivana povezanost između fosforilacije ovih kinaza i ekspimiranja gena uključenih u redoks regulaciju i metabolizam ksenobiotika kod embriona riba zebrica. Ispitivano je ekspimiranje tri klase enzima Gst: Gst *Pi* (*gstp1-2*), Gst *Alpha* (*gstal-3*) i Gst *Mu* (*gstm1-3*) nakon tretmana sa U0126 i vortmaninom. Inhibitori su dodati u stadijumu gastrule (5 hpf), a ekspimiranje *gstp1-2* (*gstp1* i *gstp2*), *gstal-3* (*gstal*, *gsta2* i *gsta3*) i *gstm1-3* (*gstm1*, *gstm2* i *gstm3*) je ispitivano u stadijumu faringule (30 hpf), izleganja (48 hpf) i larvalnom stadijumu (96 hpf).

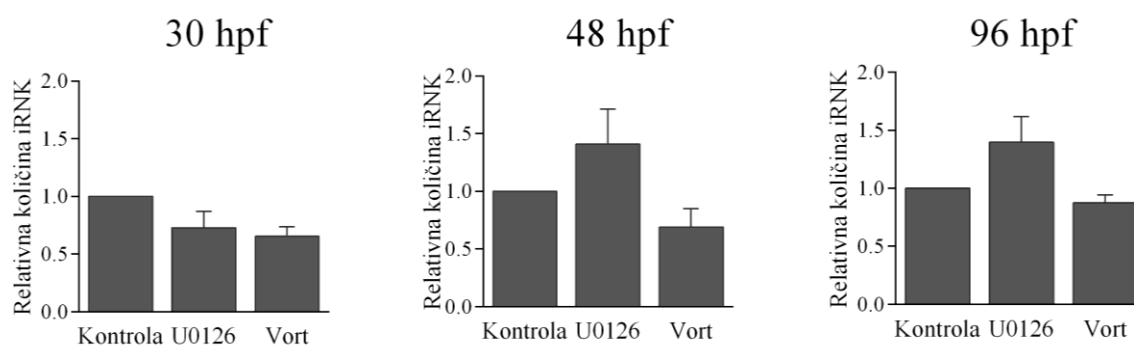
Rezultati su pokazali da je tretman sa U0126 prouzrokovao porast u ekspimiranju *gstp1-2* u stadijumu faringule (24 hpf) i izleganja (48 hpf), dok se ovaj efekat ne uočava tokom larvalnog stadijuma (96 hpf). Primena vortmanina nije dovela do promena u ekspimiranju ispitivanih gena u odnosu na kontrolu (Slika 4.3).

gstp1-2

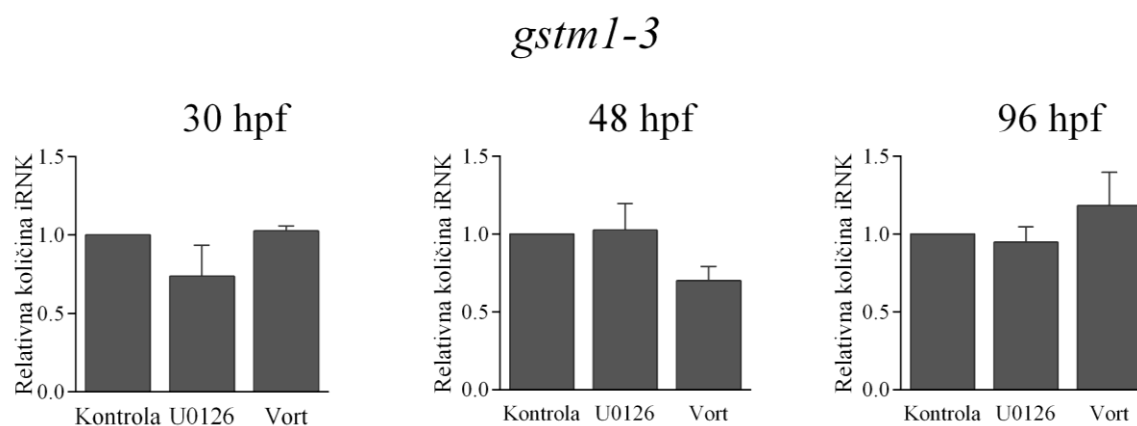
Slika 4.3. Efekat U0126 i vortmanina na eksprimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrića. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su tretirani sa U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M). Eksprimiranje *gstp1-2* je analizirano u stadijumu faringule (30 hpf), izleganja (48 hpf) i larve (96 hpf) razvoja korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4 nezavisna ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Zvezdice (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

4.2.3. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena *gstal-3* i *gstm1-3* kod embriona riba zebrića

Eksprimiranje *gstal-3* (Slika 4.4) kao i *gstm1-3* (Slika 4.5) nije bilo izmenjeno nakon tretmana sa U0126 i vortmaninom ni u jednoj od ispitivanih vremenskih tačaka.

gstal-3

Slika 4.4. Efekat U0126 i vortmanina na eksprimiranje gena *gstal-3* kod embriona riba zebrića. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su tretirani sa U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M). Eksprimiranje *gstal-3* je analizirano u stadijumu faringule (30 hpf), izleganja (48 hpf) i larve (96 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM dobijeni od 4 nezavisna ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi.

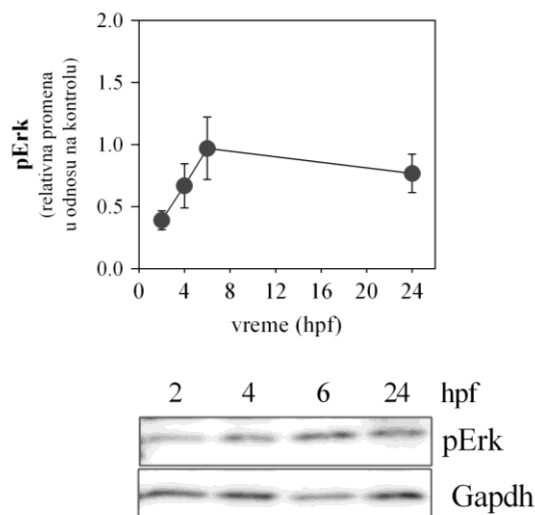


Slika 4.5. Efekat U0126 i vortmanina na eksprimiranje gena *gstm1-3* kod embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su tretirani sa U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M). Eksprimiranje *gstm1-3* je analizirano u stadijumu faringule (30 hpf), izleganja (48 hpf) i larve (96 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM dobijeni od 4 nezavisna ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi.

4.2.4. Efekat inhibicije Erk na eksprimiranje gena *gstp1-2* tokom prelaska iz stadijuma blastule u stadijum segmentacije

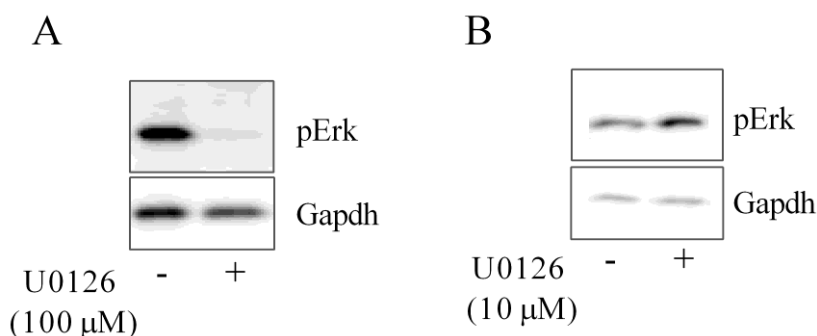
Kako je efekat inhibicije Erk na eksprimiranje *gstp1-2* opažen kroz duži vremenski period tokom razvoja embriona (od stadijuma gastrule do izleganja), dalje je ispitivana uloga ovih kinaza na eksprimiranje *gstp1-2* na samom početku embrionalnog razvića (od stadijuma blastule do gastrulacije). S obzirom da su embrioni riba zebrica kraće izlagani U0126, primenjena je veća koncentracija ovog inhibitora (100 μ M) kako bi se dobila potpunija inhibicija Erk aktivnosti.

Prvo je praćena aktivnost Erk u ranom stadijumu embrionalnog razvića od 2 hpf do 24 hpf. Aktivnost Erk je detektovan tokom svih ispitivanih vremenskih tačaka bez značajnih fluktuacija u nivou fosforilacije (Slika 4.6).



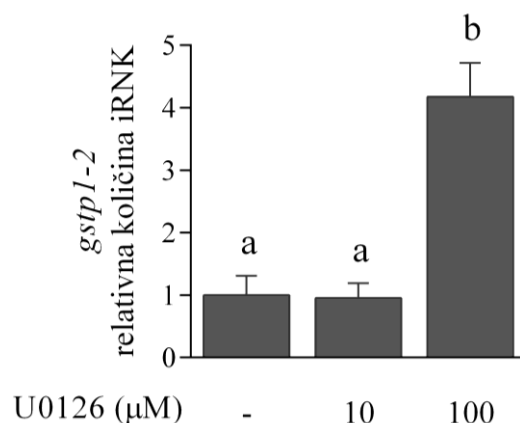
Slika 4.6. Vremenski zavisne promene u nivou pErk kod embriona riba zebrica. pErk je analiziran tokom različitih vremenskih tačaka (2, 4, 6 i 24 hpf). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 3 nezavisna ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Prikazana je reprezentativna slika dobijena metodom Western blot.

Zatim je ispitivana efikasnost U0126 u sprečavanju aktivacije Erk kod embriona riba zebrica tokom prelaza iz stadijuma blastule u stadijum segmentacije. Embrioni u stadijumu blastule (2 hpf) su tretirani sa dve koncentracije U0126 (10 μ M i 100 μ M) u trajanju od 10 h, a nakon toga je analizirana aktivnost Erk u stadijumu segmentacije (12 hpf). Rezultati su pokazali da je U0126, u koncentraciji od 100 μ M, potpuno sprečio aktivaciju Erk (Slika 4.7A), dok 10 μ M U0126 nije imao efekat na aktivnost ovih kinaza (Slika 4.7B).



Slika 4.7. Efekat U0126 na pErk kod embriona riba zebrica. Embrioni su tretirani u stadijumu blastule (2 hpf) sa U0126 (A) 100 μ M i (B) 10 μ M, a analiza pErk je rađena u stadijumu segmentacije (12 hpf). U četiri nezavisna eksperimenta sa 5-10 embriona/grupi došlo je do smanjenja pErk. Prikazana je reprezentativna slika dobijena metodom Western blot.

Nakon ispitivanja efikasnosti U0126 na aktivnost Erk tokom ranog razvića embriona, dalje je analizirano eksprimiranje gena *gstp1-2* nakon tretmana sa inhibitorom kinaza Erk, U0126. Rezultati su pokazali da je doza U0126, koja je uspešno sprečila aktivaciju Erk (U0126, 100 μ M) u ovom početnom periodu razvoja, dovela i do povećanog eksprimiranja *gstp1-2* (Slika 4.8).

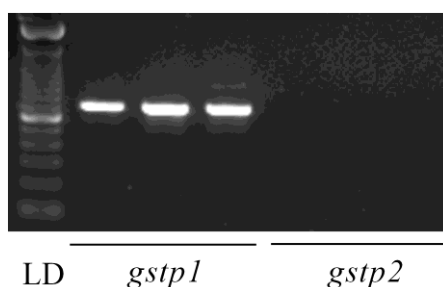


Slika 4.8. Efekat U0126 na eksprimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrica tokom prelaza iz stadijuma blastule u stadijum segmentacije. Embrioni u stadijumu blastule (2 hpf) su tretirani sa U0126 (10 i 100 μ M) u trajanju od 10 h, a nakon toga je analizirano eksprimiranje *gstp1-2* u stadijumu segmentacije (12 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM dobijeni od 4 nezavisna ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Različita slova iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike između tretiranih grupa ($p < 0,05$).

4.2.5. Efekat inibicije Erk na eksprimiranje transkripata *gstp1* i *gstp2*

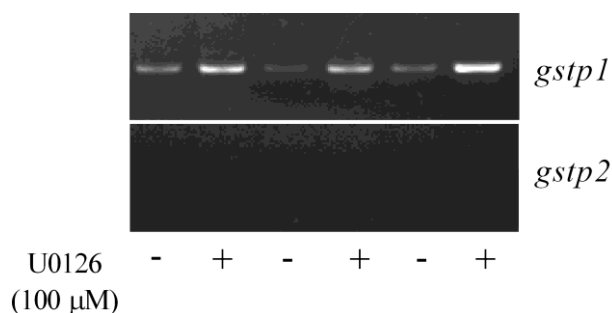
Kod riba zebrica, klasu Gst *Pi* čine dva transkripta: *gstp1* i *gstp2*. Procenat identičnosti kodirajućeg regiona između sekvenci *gstp1* i *gstp2* je 90,4%, a između aminokiselinskih sekvenci je 87% (Suzuki i sar., 2005). U svrhu detekcije koji od transkripata *gstp* je regulisan kinazama Erk, korišćeni su prajmeri dizajnirani za PCR kojima se specifično prepisuju ili *gstp1* ili *gstp2* (Glisic i sar., 2015).

Prvo je ispitano eksprimiranje transkripata *gstp1* i *gstp2* kod embriona riba zebrica starih 30 hpf u bazalnim uslovima. Rezultati su pokazali da je transkript *gstp1* dominantno eksprimiran, dok eksprimiranje *gstp2* nije uočeno (Slika 4.9).



Slika 4.9. Ekspimiranje *gstp1* i *gstp2* kod embriona riba zebrica. Na slici su predstavljeni produkti metode PCR od tri nezavisna ponavljanja od 5-10 embriona/grupi. Ista količina (60 ng) produkta metode PCR je nanešena na agarozni gel. LD - lestvica DNK (engl. *DNA Ladder*).

Nakon toga, embrioni riba zebrica su tretirani sa U0126 (100 μ M) u stadijumu blastule (2 hpf), a analiza ekspimiranja *gstp1* i *gstp2* je rađena u stadijumu segmentacije (12 hpf). Rezultati su pokazali da je U0126 doveo do povećanja ekspimiranja *gstp1* u odnosu na grupu embriona koja nije bila tretirana sa ovim inhibitorom. Promena u ekspimiranju *gstp2* nakon tretmana sa U0126 nije bila uočena (Slika 4.10).



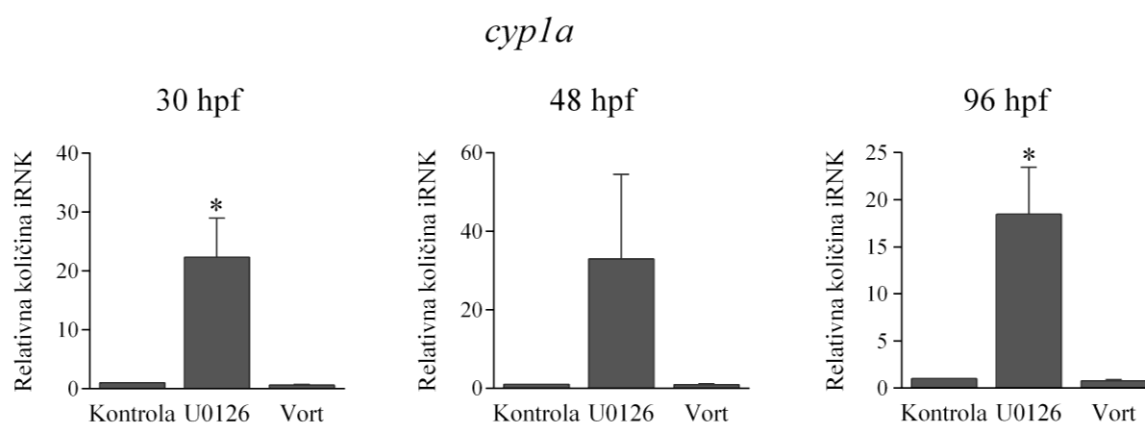
Slika 4.10. Efekat U0126 na ekspimiranje *gstp1* i *gstp2* kod embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu blastule (2 hpf) su bili tretirani sa U0126 (100 μ M). Ekspimiranje *gstp1* i *gstp2* je analizirano u periodu segmentacije (12 hpf). Na slici su predstavljeni produkti PCR metode od 3 nezavisna ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Za analizu *gstp1* nanošeno je 1 ng produkta metode PCR na agarozni gel, dok je za *gstp2* nanošeno 60 ng.

4.3. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena I faze metabolizma ksenobiotika kod embriona riba zebrica

Analizirana je uloga Erk i Akt na eksprimiranje gena za enzime I faze metabolizma ksenobiotika, *cyp1a* i *cyp3a65*. Embrioni riba zebrica u stadijumu gastrule (5 hpf) su tretirani sa U0126 (10 μ M) i vortamaninom (1 μ M), a eksprimiranje gena *cyp1a* i *cyp3a65* je ispitivano u stadijumu faringule (30 hpf), izleganja (48 hpf) i larve (96 hpf).

4.3.1. Efekat inhibicije Erk i Akt na eksprimiranje gena *cyp1a* kod embriona riba zebrica

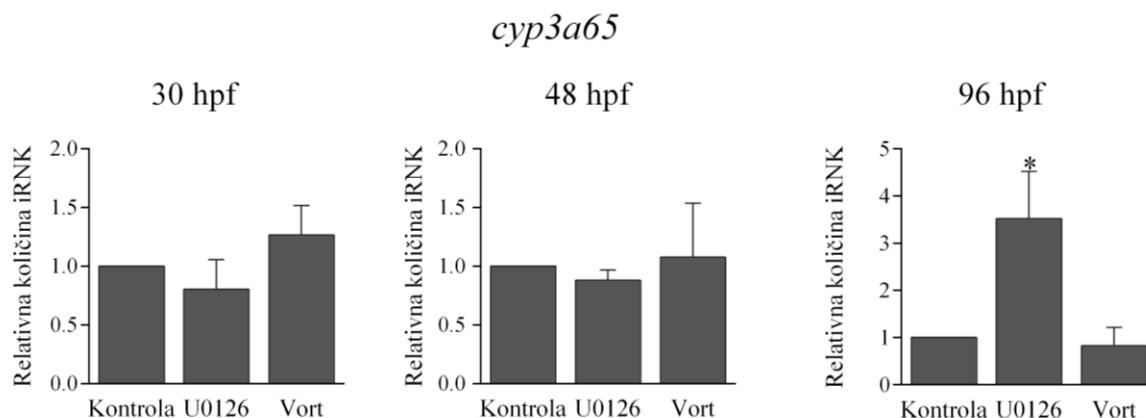
Rezultati su pokazali da je U0126 doveo do statistički značajanog porasta eksprimiranja gena *cyp1a* u stadijumu faringule (30 hpf) i larve (96 hpf) u odnosu na kontrolnu grupu. U stadijumu izleganja (48 hpf) je takođe uočen porast eksprimiranja *cyp1a*, ali primećeno povećanje nije bilo statistički značajno. Dodatak vortmanina nije imao efekat na eksprimiranje ispitivanog gena (Slika 4.11).



Slika 4.11. Efekat U0126 i vortmanina na eksprimiranje gena *cyp1a* kod embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su tretirani sa U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M). Eksprimiranje *cyp1a* je analizirano u stadijumu faringule (30 hpf), izleganja (48 hpf) i larve (96 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM dobijeni od 4 nezavisna ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Zvezdice (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

4.3.2. Efekat inhibicije Erk i Akt na ekspimiranje gena *cyp3a65* kod embriona riba zebrica

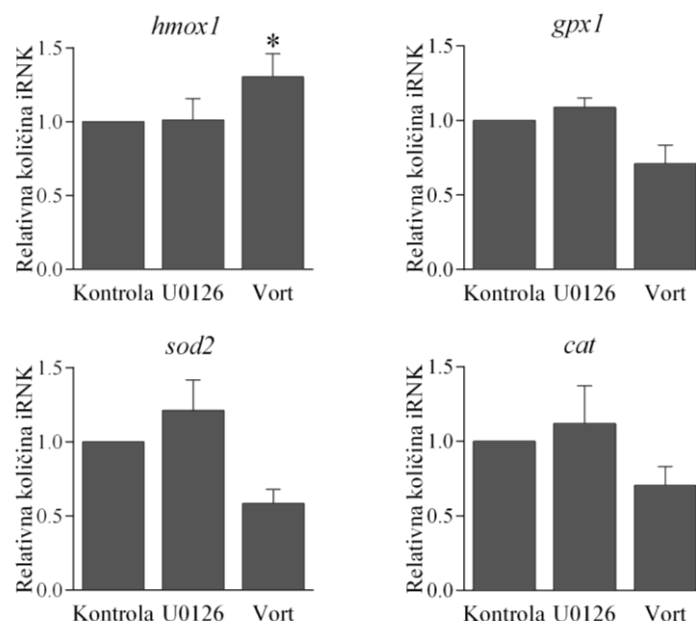
Eksprimiranje gena *cyp3a65* je poraslo jedino nakon produženog izlaganja U0126, odnosno u larvanom stadijumu (96 hpf), dok vortmanin nije ispoljio efekat (Slika 4.12).



Slika 4.12. Efekat U0126 i vortmanina na ekspimiranje gena *cyp3a65* kod embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su tretirani sa U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M). Ekspimiranje *cyp3a65* je analizirano u stadijumu faringule (30 hpf), izleganja (48 hpf) i larve (96 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM dobijeni od 4 nezavisna ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Zvezdice (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

4.4. Efekat inhibicije Erk i Akt na ekspimiranje antioksidativnih gena kod embriona riba zebrica

Analizirana je uloga Erk i Akt na ekspimiranje gena za enzime koji pripadaju antioksidativnom odbrambenom sistemu. Embrioni riba zebrica su u stadijumu gastrule (5 hpf) izlagani U0126 (10 μ M) i vortmaninu (1 μ M) do stadijuma izleganja (48 hpf). Nakon toga je praćeno ekspimiranje gena za Hmox1, Gpx1, Sod2 i Cat. Rezultati su pokazali da U0126 ne remeti ekspimiranje *hmox1*, *gpx1*, *sod2* i *cat* u odnosu na kontrolnu grupu. Vortmanin je doveo do povećanja ekspimiranja *hmox1*, dok nije imao efekta na ekspimiranje ostalih ispitivanih gena (Slika 4.13).



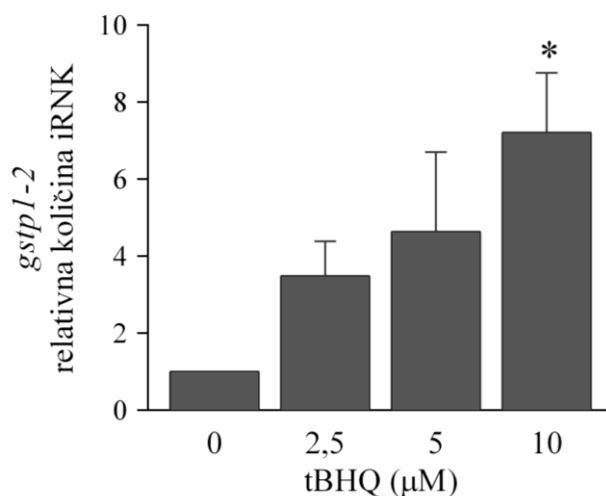
Slika 4.13. Efekat U0126 i vortmanina na ekspimiranje gena za antioksidativne enzime kod embriona riba zebriica. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su tretirani sa U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M) do stadijuma izleganja (48 hpf). Ekspimiranje *hmx1*, *gpx1*, *sod2* i *cat* je analizirano korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM dobijeni od 4 nezavisna ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Zvezdice (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

4.5. Uloga Erk i Akt na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebriica tokom oksidativnog stresa

4.5.1. Efekat tBHQ na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebriica

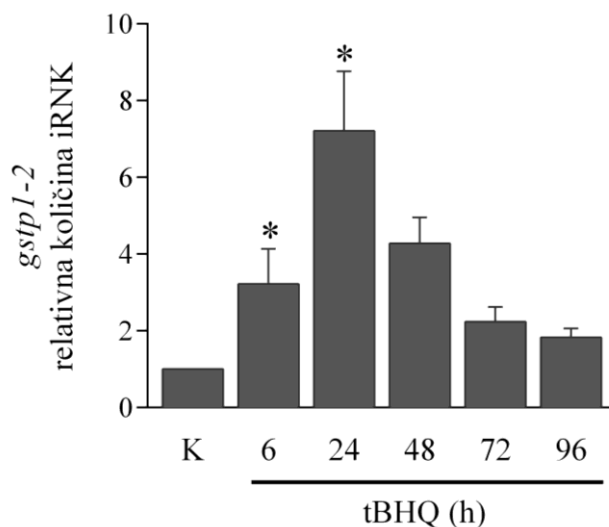
Dalja ispitivanja u ovoj disertaciji su se odnosila na ispitivanje uloge Erk i Akt na ekspimiranje *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa. tBHQ je korišćen kao supstanca koja prouzorkuje oksidativni stres i povećava ekspimiranje *gstp1-2* kod embriona riba zebriica (Kobayashi i sar., 2002). Na početku eksperimenata je definisana koncentracija i vremenski period u kome tBHQ dovodi do porasta ekspimiranja *gstp1-2*. Embrioni riba zebriica u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani različitim koncentracijama tBHQ, a u stadijumu izleganja (48 hpf) su sakupljeni za analizu ekspimiranja *gstp1-2*.

Koncentracija od 30 μM tBHQ je nakon 6 h inkubacije dovela do povećane smrtnosti embriona, tako da ona nije korišćena za dalja ispitivanja (rezultati nisu prikazani). Rezultati su pokazali da je tretman embriona sa 10 μM tBHQ doveo do statistički značajnog povećanja ekspimiranja *gstp1-2*. Ostale koncentracije tBHQ su takođe dovele do porasta u ekspimiranju *gstp1-2*, ali ova povećanja nisu bila statistički značajna (Slika 4.14).



Slika 4.14. Efekat različitih koncentracija tBHQ na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrića. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su bili izloženi različitim koncentracijama tBHQ (0, 2,5, 5 i 10 μM) u trajanju od 24 h. Ekspimiranje *gstp1-2* je analizirano u stadijumu izleganja (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM dobijeni od 4-5 nezavisnih ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Zvezdice (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

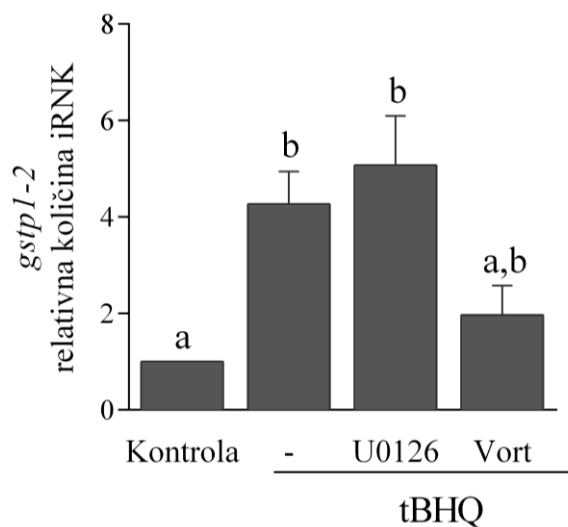
Da bi se utvrdilo vreme kada tretman tBHQ dovodi do najvećeg ekspimiranja *gstp1-2*, embrioni su sakupljeni u različitim vremenskim intervalima nakon tretmana sa tBHQ (10 μM). Rezultati su pokazali da tBHQ dovodi do statistički značajnog porasta ekspimiranja *gstp1-2* u prvih 6 h i 24 h tretmana. Nakon dužeg izlaganja embriona ovoj supstanci, nivo ekspimiranja *gstp1-2* opada do kontrolne vrednosti (Slika 4.15).



Slika 4.15. Efekat dužine trajanja tretmana sa tBHQ na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrića. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su izloženi tBHQ (10 μ M), a ekspimiranje *gstp1-2* je analizirano u nekoliko različitih vremenskih tačaka nakon tretmana (30, 48, 72, 96 i 120 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4-5 nezavisnih ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Zvezdice (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom (K) ($p < 0,05$).

Ni jedna od korišćenih koncentracija tBHQ nije pokazala toksičnost niti je dovođila do morfoloških promena kod embriona u ispitivanim vremenskim tačkama. Za dalju analizu uloge Erk i Akt u regulaciji ekspimiranja *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa korišćen je tretman sa 10 μ M tBHQ u trajanju od 24 h.

Da bi se ispitala uloga Erk i Akt u povećanom ekspimiranju *gstp1-2* kod embriona riba zebrića tretiranih sa tBHQ, U0126 (10 μ M) i vortmanin (1 μ M) su dodati tokom stadijuma gastrule (5 hpf), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf), su tretirani sa tBHQ (10 μ M). Ekspimiranje *gstp1-2* je analizirano u periodu izleganja (48 hpf). Rezultati su pokazali da U0126 i vortmanin nisu remetili povećano ekspimiranje *gstp1-2* koje je indukovano od strane tBHQ kod embriona riba zebrića (Slika 4.16).

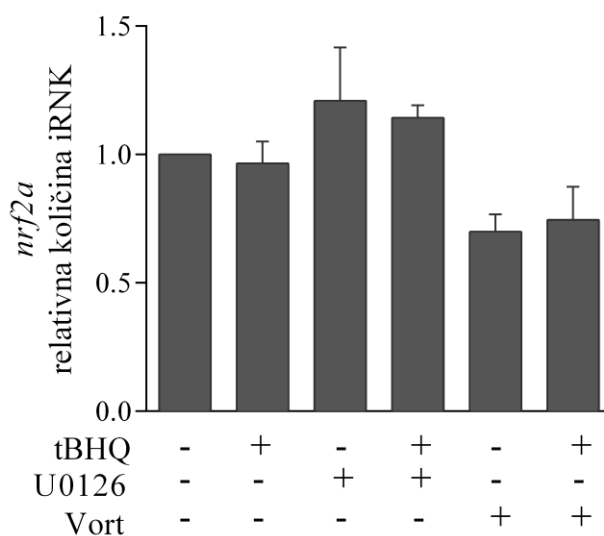


Slika 4.16. Efekat U0126 i vortmanina na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebriica tretiranih sa tBHQ. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su tretirani sa U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf), sa tBHQ (10 μ M). Analiza ekspimiranja *gstp1-2* je rađena u periodu izleganja (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4-5 nezavisnih ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Različita slova iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike između tretiranih grupa ($p < 0,05$).

4.5.2. Efekat inhibicije Erk i Akt na ekspimiranje gena *nrf2a* kod embriona riba zebriica tretiranih sa tBHQ

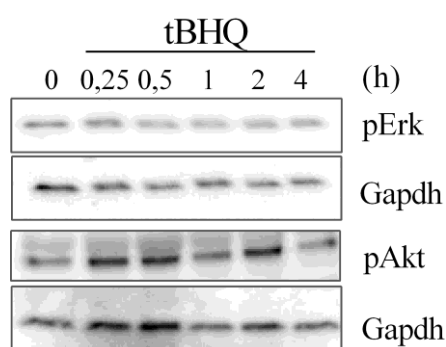
Pošto je transkripcioni faktor Nrf2a uključen u regulaciju ekspimiranja *gstp1-2*, ispitivan je efekat inhibicije Erk i Akt na ekspimiranje gena *nrf2a* kod embriona riba zebriica tretiranih sa tBHQ. Embrioni riba zebriica u stadijumu gastrule (5 hpf) su izloženi U0126 (10 μ M) i vortmaninu (1 μ M), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf), su tretirani sa tBHQ (10 μ M). Ekspimiranje *nrf2a* je analizirano u stadijumu faringule (48 hpf). Rezultati su pokazali da tBHQ ne dovodi do promene u ekspimiranju gena *nrf2a*. Primena U0126 i vortmanina samostalno ili zajedno sa tBHQ takođe nije remetila ekspimiranje ovog transkripcionog faktora kod embriona riba zebriica (Slika 4.17).



Slika 4.17. Efekat U0126 i vortmanina na eksprimiranje gena *nrf2a* kod embriona riba zebriica tretiranih sa tBHQ. Embrioni su u stadijumu gastrule (5 hpf) tretirani sa U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf), dodat je tBHQ (10 μ M). Eksprimiranje *nrf2a* je analizirano u stadijumu izleganja (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4-5 nezavisnih ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi.

4.5.3. Efekat tBHQ na aktivaciju Erk i Akt kod embriona riba zebriica

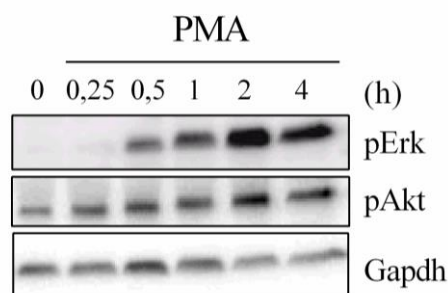
Dalje je analiziran efekat tBHQ na nivo pErk i pAkt kod embriona riba zebriica. Embrioni riba zebriica u stadijumu faringule (24 hpf) su izloženi tBHQ (10 μ M), a pErk i pAkt su praćeni u nekoliko vremenskih taćaka nakon tretmana (0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h). Rezultati su pokazali da tBHQ nije menjao aktivnost Erk i Akt kod embriona riba zebriica u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 4.18).



Slika 4.18. Efekat tBHQ na pErk i pAkt kod embriona riba zebrića. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su izlagani tBHQ (10 μ M) i nivoi pErk i pAkt su analizirani u različitim vremenskim tačkama metodom Western blot. U 4-5 nezavisnih eksperimenata sa 5-10 embriona/grupi nije pokazana promena pErk i pAkt. Prikazana je reprezentativna slika dobijena metodom Western blot.

4.5.4. Efekat PMA na aktivaciju Erk i Akt kod embriona riba zebrića

Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa PMA, a nivoi pErk i pAkt su praćeni u različitim vremenskim intervalima nakon tretmana (0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h). Rezultati su pokazali da PMA povećava pErk u nekoliko vremenskih tačaka (0,5, 1, 2 i 4 h) nakon tretmana, dok je porast pAkt uočen 2 i 4 h nakon dodavanja PMA (Slika 4.19).

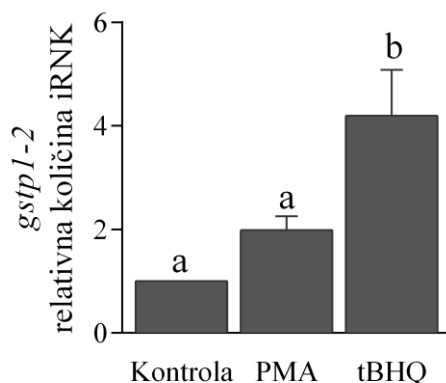


Slika 4.19. Efekat PMA na nivo pErk i pAkt kod embriona riba zebrića. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa PMA (200 μ g/L) i nivoi pErk i pAkt su analizirani u različitim vremenskim tačkama metodom Western blot. U 4-5 nezavisnih eksperimenata sa 5-10 embriona/grupi pokazano je povećanje pErk i pAkt. Prikazana je reprezentativna slika dobijena metodom Western blot.

U cilju daljeg ispitivanja uloge Erk i Akt u regulaciji ekspimiranja *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa korišćen je i PMA. PMA je izabran zbog sposobnosti da prouzrokuje oksidativni stres kod embriona riba zebrica (Li i sar., 2013) i da aktivira signalni put kinaza ERK u različitim tipovima adultnih ćelija (Davis i sar., 2018).

4.5.5. Efekat PMA na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrica

Rezultati su pokazali da tretman PMA u trajanju od 24 h ne dovodi do povećanja ekspimiranja *gstp1-2* u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, ekspimiranje *gstp1-2* kod embriona tretiranih sa PMA je bilo znatno niže nego kod embriona riba zebrica izloženih tBHQ (Slika 4.20).



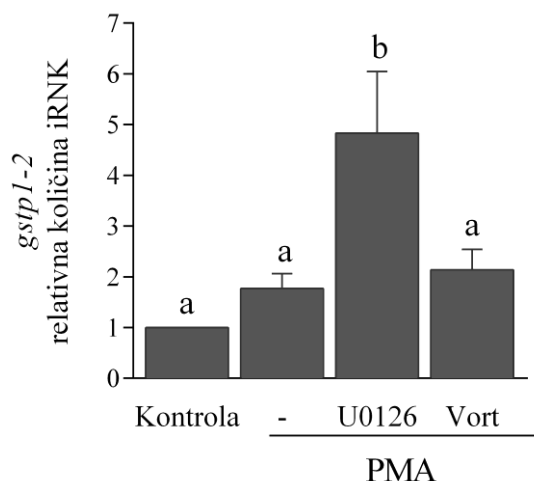
Slika 4.20. Efekat PMA i tBHQ na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrica.

Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa PMA (200 $\mu\text{g/L}$) i tBHQ (10 μM) i nakon 24 h je analizirano ekspimiranje *gstp1-2* u stadijumu izleganja (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4-5 nezavisnih ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Različita slova iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike između grupa ($p < 0,05$).

4.5.6. Efekat inhibicije Erk i Akt na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA

U cilju daljeg definisanja uloge Erk i Akt na ekspimiranje *gstp1-2* kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA, embrioni su izloženi U0126 (10 μM) i vortmaninu (1 μM) u periodu gastrule (5 hpf), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf) je dodat PMA (200 $\mu\text{g/L}$). Analiza ekspimiranja *gstp1-2* je urađena u stadijumu izleganja (48 hpf).

Rezultati su pokazali da je inhibicija Erk dovela do povećanja eksprimiranja *gstp1-2* kod embriona tretiranih sa PMA u odnosu na samostalnu primenu PMA i kontrolnu grupu. Primena vortmanina kod embriona riba zebriica tretiranih sa PMA nije remetila eksprimiranje *gstp1-2* u odnosu na samostalnu primenu PMA i kontrolnu grupu (Slika 4.21).



Slika 4.21. Efekat U0126 i vortmanina na eksprimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebriica tretiranih sa PMA. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su izloženi U0126 (10 μ M) i Vort (1 μ M), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf), dodat je PMA (200 μ g/L).

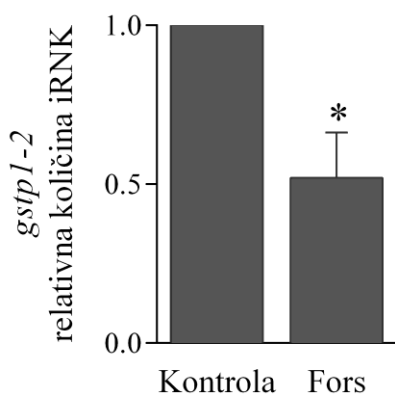
Eksprimiranje *gstp1-2* je analizirano u periodu izleganja (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4-5 nezavisnih ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Različita slova iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike između tretiranih grupa ($p < 0,05$).

4.6. Uloga cAMP/Pka/Creb na eksprimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebriica

4.6.1. Efekat forskolina na eksprimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebriica

Pošto je pokazano da se cAMP odgovorni element (engl. *cAMP response element*, CRE) nalazi u promotoru humanog *GSTP* (Lo i Ali-Osman, 2007) i da regulacija eksprimiranja *GSTP* zavisi od cikličnog adenozin monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP), protein kinaze A (PKA) i CREB (Lo i Ali-Osman, 2007), ispitivali smo ulogu cAMP/Pka/Creb u regulaciji eksprimiranja *gstp1-2* kod embriona riba zebriica. Embrioni su u stadijumu faringule (24 hpf) tretirani forskolinom,

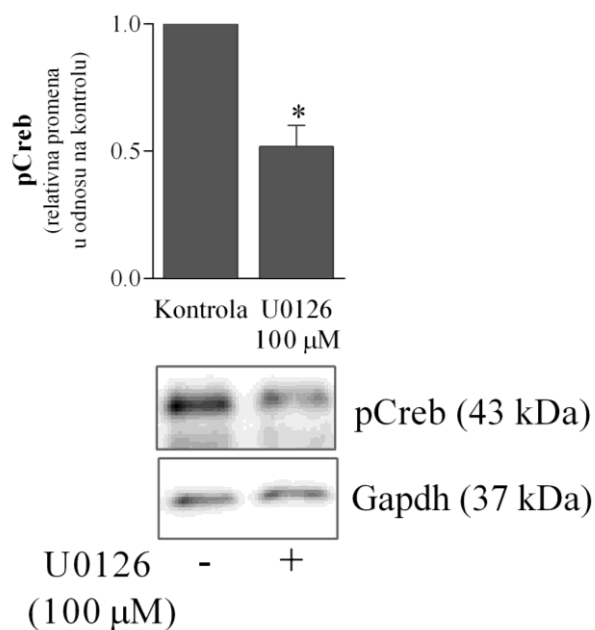
aktivatorom signalnog puta cAMP/PKA, a ekspimiranje *gstp1-2* je praćeno 6 h nakon tretmana. Rezultati su pokazali da forskolin smanjuje ekspimiranje *gstp1-2* u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 4.22).



Slika 4.22. Efekat forskolina na ekspimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrića. Embrioni su u stadijumu faringule (24 hpf) tretirani forskolinom (50 μ M, Fors) u trajanju od 6 h, a zatim je analizirano ekspimiranje *gstp1-2* korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4-5 nezavisnih ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Zvezdica (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

4.6.2. Efekat inhibicije Erk na aktivaciju Creb kod embriona riba zebrića

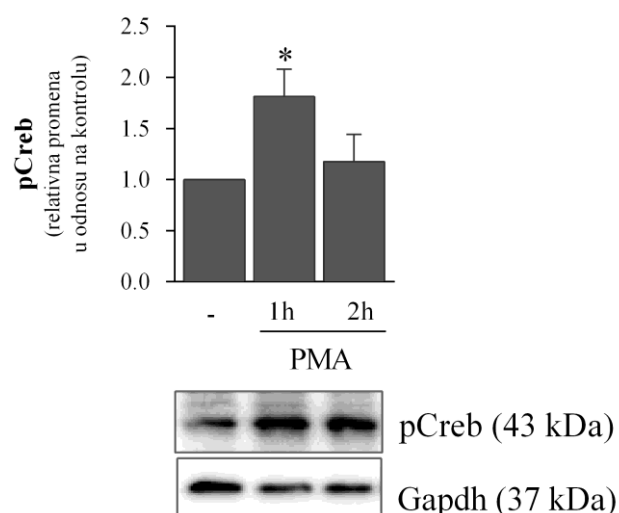
Dalje je ispitivan efekat inhibicije kinaza Erk na fosforilaciju Creb (pCreb) proteina kod embriona riba zebrića. Embrioni u stadijumu blastule (2 hpf) su tretirani sa U0126 (100 μ M), a nivo pCreb je praćen u periodu segmentacije (12 hpf). Rezultati su pokazali da primena U0126 smanjuje pCreb kod embriona riba zebrića (Slika 4.23).



Slika 4.23. Efekat U0126 na nivo pCreb kod embriona riba zebrića. Embrioni u stadijumu blastule (2 hpf) su tretirani sa U0126 (100 μM), a nivo pCreb je analiziran u stadijumu segmentacije (12 hpf) metodom Western blot. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM od 4-5 nezavisnih ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Zvezdica (*) iznad stubića predstavlja statistički značajnu razliku u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$). Prikazana je reprezentativna slika dobijena metodom Western blot.

4.6.3. Efekat PMA na aktivaciju Creb kod embriona riba zebrića

Analiziran je i efekat PMA na fosforilaciju proteina Creb kod embriona riba zebrića. Rezultati su pokazali da dodavanje PMA u trajanju od 1 h dovodi do povećanja aktivnosti Creb kod embriona u stadijumu faringule (24 hpf) (Slika 4.24).



Slika 4.24. Efekat PMA na fosforilaciju Creb kod embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa PMA (200 $\mu\text{g/L}$) u trajanju od 1 h i 2 h, a nakon toga, nivo pCreb je analiziran metodom Western blot. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 4-5 nezavisnih ponavljanja sa 5-10 embriona/grupi. Zvezdica (*) iznad stubića predstavlja statistički značajnu razliku u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$). Prikazana je reprezentativna slika dobijena metodom Western blot.

4.6.4. Kompjuterska analiza Creb vezujućih mesta na promotorskim sekvencama *gstp1* i *gstp2*

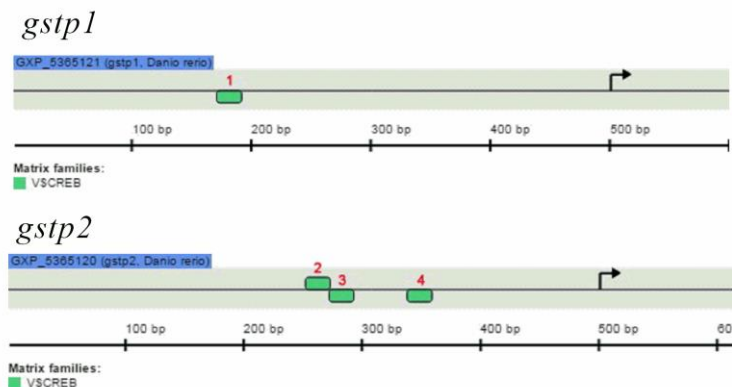
Kompjuterskom analizom je pronađen Creb vezujući element (CRE) u promotorima *gstp1* i *gstp2* korišćenjem softvera MatInspector (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Potencijalna CREB vezujuća mesta na promotorskim sekvencama *gstp1* i *gstp2*. Potencijalna CREB vezujuća mesta određena pomoću analize promotorskih sekvenci *gstp1* (GeneID 79381) i *gstp2* (GeneID 553169) kod zebrica korišćenjem softvera MatInspector.

Naziv gena	Broj mesta	Mesto	Lanac	Sekvenca	Pozicija na promotoru*
<i>gstp1</i>	1	CRE	-	ttgtaTGATgtggatgtaat	-330
	2	E4BP4	+	atatatTTTGTAAagttcaa	-249
<i>gstp2</i>	3	E4BP4	-	tttgggtacGTAAGttactt	-229
	4	ATF-like 3	-	gtttGTTGtcgtacttgaac	-163

Velika slova: srž sekvence; * relativno u odnosu na transkripciono mesto.

U promotorima *gstp1* i *gstp2* su identifikovana CRE slična mesta, ukazujući na mogućnost regulacije eksprimiranja *gstp1-2* koja zavisi od Creb tokom ranog embrionalnog razvoja riba zebrića (Slika 4.25).



Slika 4.25. Kompjuterska analiza CRE u promotorskim sekvencama *gstp1* i *gstp2*. Šematski prikaz Creb vezujućih mesta na promotorskim sekvencama *gstp1* i *gstp2* je utvrđen pomoću softvera MatInspector (Genomatix Software Suite). Zeleni kvadrati obeleženi brojevima (brojevi odgovaraju rednim brojevima u tabeli 4.1) predstavljaju Creb vezujuća mesta, plavi kvadrati predstavljaju tražene sekvence od 601 (u promotoru *gstp1*) i 614 (u promotoru *gstp2*) baznih parova. Strelice predstavljaju početno mesto transkripcije (engl. *transcriptional start site*, TSS).

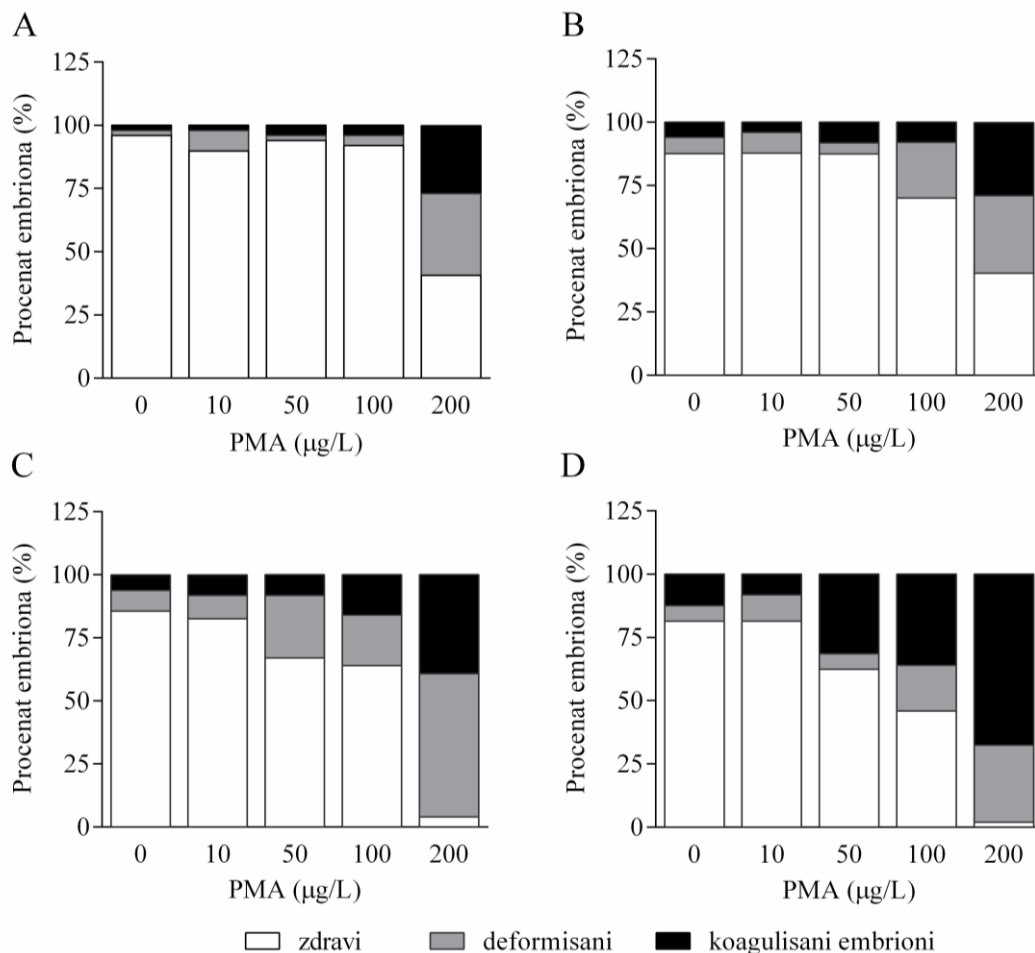
4.7. Uloga Pkc signalizacije u ranoj embriogenezi zebrića

Dalji eksperimenti u ovoj disertaciji su obuhvatali ispitivanje uloge signalizacije PKC tokom ranog razvića embriona riba zebrića.

4.7.1. Efekat PMA na razvoj i stopu preživljavanja embriona riba zebrića

U svrhu ispitivanja uloge signalizacije Pkc na razvoj i preživljavanje, embrioni riba zebrića u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa PMA u različitim koncentracijama (0, 10, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$), a razvoj embriona je praćen svaka 24 h tokom izleganja (48 hpf) i tokom stadijuma larve (72, 96 i 120 hpf). Rezultati su pokazali da PMA dovodi do koagulacije i pojave deformiteta kod embriona riba zebrića. U prvih 24 h i 48 h tretmana najveća koncentracija PMA (200 $\mu\text{g/L}$) je dovela do 28% koaguliranih i 31% deformiranih embriona. Nakon 72 h broj koaguliranih se povećao na 40%, a deformiranih na 57%, dok je nakon 96 h tretmana 68% embriona koaguliralo, a 30% je

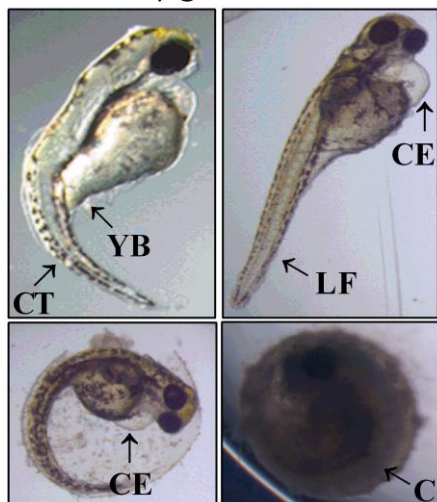
pokazalo različite vrste deformiteta. Takođe, nakon dužeg tretmana i niže doze PMA (50 i 100 $\mu\text{g/L}$) su prouzrokovale koagulaciju embriona ili pojavu deformiteta u odnosu na kraće vreme izlaganja (Slika 4.26).



Slika 4.26. Efekat PMA na preživljavanje i pojavu deformiteta kod embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su bili izloženi različitim koncentracijama PMA (0, 10, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$), a morfološke karakteristike su analizirane nakon (A) 48 hpf (B), 72 hpf, (C) 96 hpf i (D) 120 hpf. Procenat zdravih, deformisanih i koaguliranih embriona predstavlja srednju vrednost od 5-7 nezavisnih ponavljanja sa 15-20 embriona/grupi, a procenat je izražen u odnosu na kontrolnu grupu.

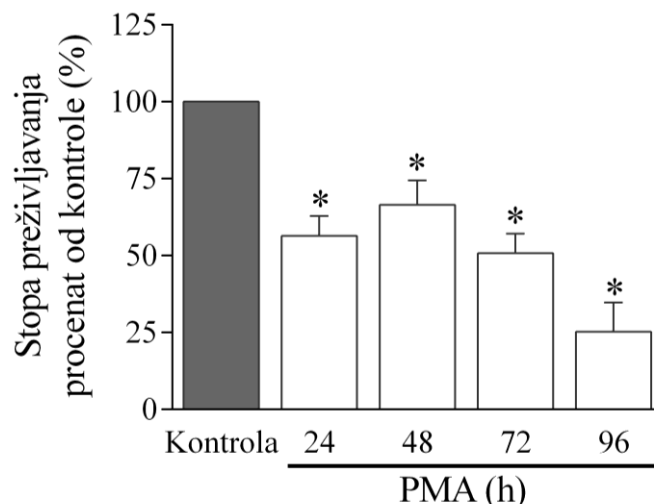
Deformiteti koji su uočeni kod embriona tretiranih sa PMA (200 $\mu\text{g/L}$) su obuhvatali izduženu žumančanu kesu, srčani edem, usporeni krvotok, pulsirajući protok krvi, smanjen puls, izduženo srce, deformacije mozga, nedostatak repnog peraja, krivudav rep i zastoj u razvoju (tokom posmatranja embriona nakon 48 h tretmana oni izgledaju isto kao prethodni dan) (Slika 4.27).

Kontrola

PMA 200 $\mu\text{g/L}$ 

Slika 4.27. Efekat PMA na razvoj deformiteta kod embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa PMA (200 $\mu\text{g/L}$), a morfološke karakteristike su analizirane u stadijumu larve (96 hpf). Srčani edem (engl. *cardiac edema*, CE), izdužena žumančana kesica (engl. *development of yolk bags*, YB), krivudav rep (engl. *curved tail*, CT), nedostatak repnog peraja (engl. *lack of tail fins*, LF), koagulacija (engl. *coagulation*, C). Embrioni su posmatrani u 5-7 nezavisnih ponavljanja sa 15-20 embriona/grupi. Prikazane su reprezentativne slike.

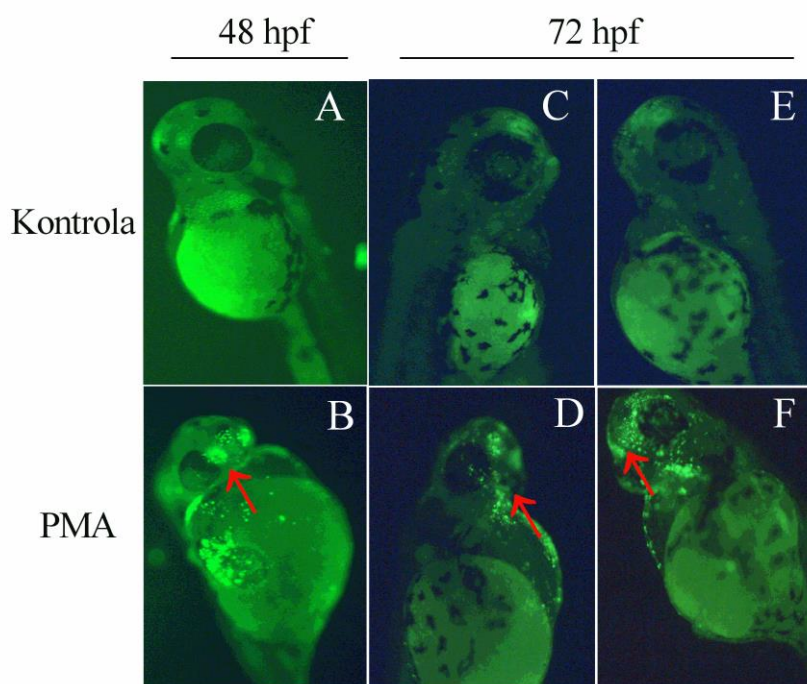
PMA smanjuje stopu preživljavanja embriona u poređenju sa kontrolnom grupom embriona. Iako su uočene značajne razlike u stopi preživljavanja u prvih 24 h tretmana (56%), najniža stopa preživljavanja je zabeležena nakon 96 h inkubacije (25%) (Slika 4.28).



Slika 4.28. Efekat PMA na stopu preživljavanja embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su tretirani sa PMA (200 $\mu\text{g/L}$), a broj uginulih embriona je beležen nakon 24, 48, 72 i 96 h izlaganja. Rezultati su dobijeni od 5-7 nezavisnih ponavljanja sa 15-20 embriona/grupi, izraženi kao procenat od kontrolne grupe i prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. Zvezdice (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

4.7.2 Efekat PMA na pojavu apoptoze kod embriona riba zebrica

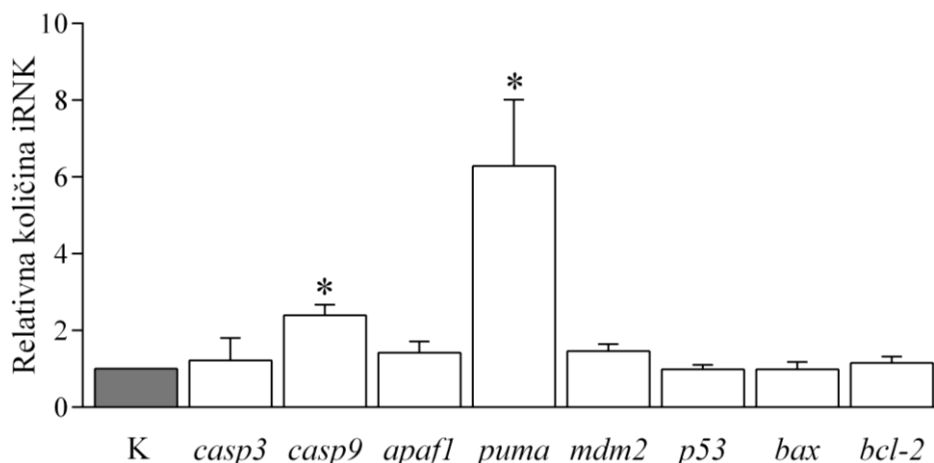
Pošto je uočena povećana smrtnost embriona riba zebrica nakon tretmana sa PMA, analizirana je pojava apoptoze kod embriona koji su bili izloženi PMA. Nakon tretmana sa PMA, embrioni su tretirani akridin oranž bojom, a pojava apoptoze je praćena pod fluorescentnim mikroskopom. Uočen je veći broj apoptotičnih ćelija kod embriona koji su bili izloženi PMA (200 $\mu\text{g/L}$) u odnosu na kontrolu. Veći broj apoptotičnih ćelija je posebno izražen u moždanoj regiji, lokalizovane oko očne regije (Slika 4.29).



Slika 4.29. Efekat PMA na apoptozu kod embriona riba zebrica. (A) Kontrola 48 hpf; (C, E) Kontrola 72 hpf. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su izloženi PMA (200 $\mu\text{g/L}$) u trajanju od (B) 24 h i (D, F) 48 h. Nakon inkubacije embrioni su tretirani akridin oranž bojom. Crvene strelice pokazuju na apoptotične ćelije. Embrioni su posmatrani u 4 nezavisna ponavljanja od 10-15 embriona/grupi. Prikazane su reprezentativne slike sa fluorescentnog mikroskopa.

4.7.3. Efekat PMA na ekspimiranje pro- i antiapoptotičnih gena kod embriona riba zebrica

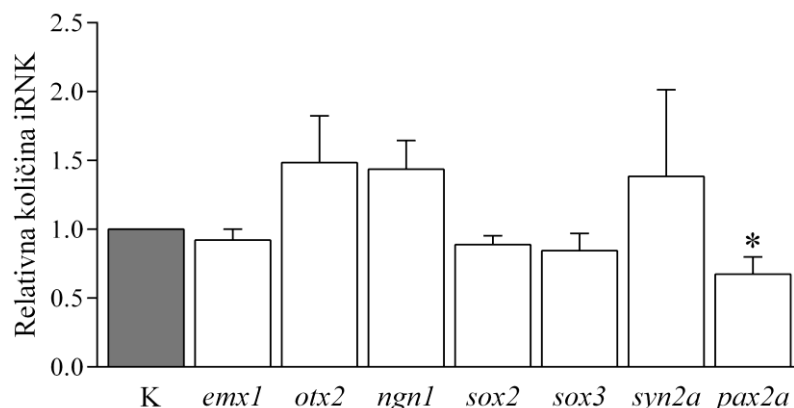
Pošto je uočen porast broja apoptotičnih ćelija kod embriona riba zebrica izloženih PMA, analizirano je ekspimiranje gena uključenih u ovaj proces. Tretman embriona u stadijumu faringule (24 hpf) sa PMA (200 $\mu\text{g/L}$) u trajanju od 24 h prouzrokovao je porast u ekspimiranju dva proapoptotična gena, *casp9* i *puma*, u odnosu na kontrolu. Ekspimiranje drugih ispitivanih proapoptotičnih gena (*casp3*, *apaf1*, *p53* i *bax*) ostalo je nepromenjeno, kao i nivo ekspimiranja dva antiapoptotična gena *mdm2* i *bcl-2* (Slika 4.30).



Slika 4.30. Efekat PMA na ekspimiranje pro- i antiapoptičnih gena. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su izlagani PMA (200 μ g/L), a analiza ekspimiranja *casp3*, *casp9*, *apaf1*, *puma*, *mdm2*, *p53*, *bax* i *bcl-2* je rađena u stadijumu faringule (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 6-8 nezavisnih ponavljanja sa 5 embriona/grupi. Zvezdice (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom (K) ($p < 0,05$).

4.7.4. Efekat PMA na ekspimiranje marker gena razvoja mozga

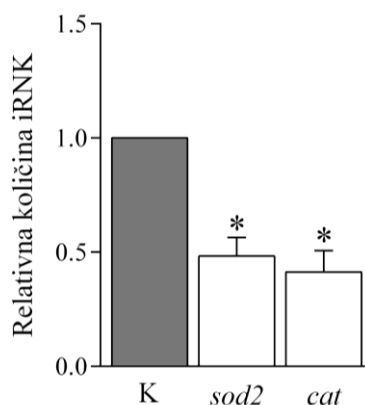
Pošto su apoptotične ćelije uočene u moždanoj regiji embriona riba zebrića, dalje je ispitivan efekat PMA na ekspimiranje moždanih i nervnih razvojnih gena. Rezultati su pokazali značajan pad u ekspimiranju gena *pax2a*, koji je marker za optičku stabljiku, granicu između srednjeg mozga i zadnjeg mozga, optičke vezikule i neurona kičmene moždine, nakon inkubacije sa PMA u poređenju sa kontrolnom grupom embriona. Sa druge strane, ekspimiranje nervnih progenitorskih ćelijskih markera (*ngn1*, *sox2* i *sox3*), telencefalona (*emx1*), srednjeg mozga (*otx2*) i markera formiranja sinapsi (*syn2a*) nisu bili značajno izmenjeni nakon tretmana sa PMA (Slika 4.31).



Slika 4.31. Efekat PMA na ekspimiranje marker gena razvoja mozga kod embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su izlagani PMA (200 $\mu\text{g/L}$), a analiza ekspimiranja *emx1*, *otx2*, *ngn1*, *sox2*, *sox3*, *syn2a* i *pax2a* je rađena u stadijumu faringule (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 6-8 nezavisnih ponavljanja sa 5 embriona/grupi. Zvezdica (*) iznad stubića predstavlja statistički značajnu razliku u poređenju sa kontrolom (K) ($p < 0,05$).

4.7.5. Efekat PMA na ekspimiranje antioksidativnih gena kod embriona riba zebrica

Analizirano je i ekspimiranje dva antioksidativna gena nakon tretmana embriona riba zebrica sa PMA. Rezultati su pokazali da je tretman embriona sa PMA (200 $\mu\text{g/L}$) u trajanju od 24 h doveo do smanjenja ekspimiranja *sod2* i *cat* u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 4.32).

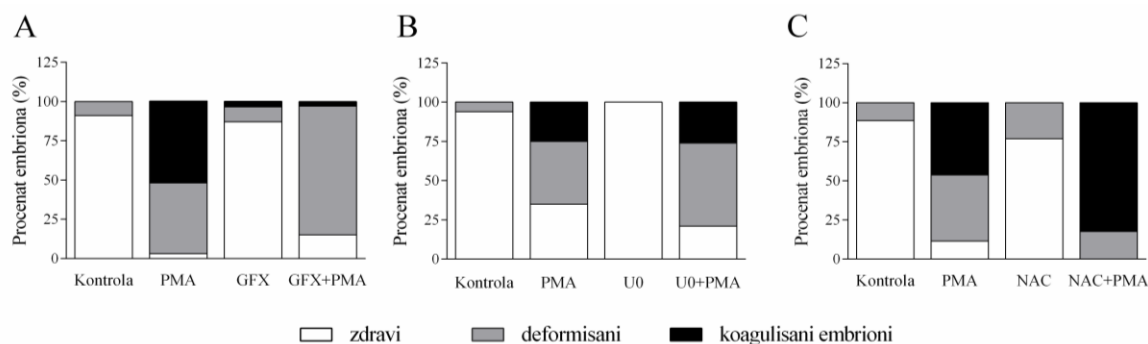


Slika 4.32. Efekat PMA na ekspimiranje antioksidativnih gena kod embriona riba zebrica. Embrioni u stadijumu faringule (24 hpf) su izlagani PMA (200 $\mu\text{g/L}$), a analiza ekspimiranja *sod2* i *cat* je rađena u stadijumu faringule (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 6-8 nezavisnih ponavljanja sa 5 embriona/grupi. Zvezdice (*) iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom (K) ($p < 0,05$).

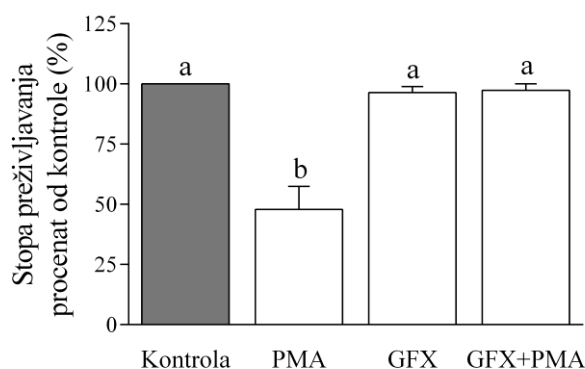
4.7.6. Efekat inhibicije Pkc, Erk i ROS na razvoj i preživljavanje kod embriona riba zebrića izloženih PMA

U cilju nalaženja uloge pojedinih signalnih puteva u pojavi deformiteta i smrtnosti kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA, embrioni su izlagani farmakološkom inhibitoru Pkc (GFX; 20 μ M), Erk (U0126; 10 μ M) i ROS (NAC; 50 μ M). Primena inhibitora u napred navedenim koncentracijama u našim uslovima nije dovela do morfoloških promena kod embriona. Takođe, pokazano je da 50-100 μ M NAC ne izaziva toksične efekte kod embriona riba zebrića, dok su koncentracije 500 μ M i više uzrokovale različite razvojne deformitete (Timme-Laragy i sar., 2009).

Svi inhibitori su dodati u stadijumu gastrule (5 hpf), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf), embrioni su tretirani sa PMA (200 μ g/L). Analiza deformiteta i stope preživljavanja embriona je određivana tokom izleganja (48 hpf). Rezultati su pokazali da je inhibicija aktivacije Pkc sprečila koagulaciju (Slika 4.33A) i poboljšala stopu preživljavanja (Slika 4.34) ali nije sprečila pojavu deformiteta kod embriona tretiranih sa PMA. Sa druge strane, inhibicija Erk i ROS nije otklonila deformitete niti poboljšala stopu preživljavanja kod embriona izloženih PMA (Slika 4.33B i 4.33C).



Slika 4.33. Efekat GFX, U0126 i NAC na razvoj i preživljavanje embriona riba zebrića tretiranih sa PMA. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su izlagani inhibitorima, a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf), dodat je PMA (200 μ g/L). Morfološke karakteristike, koagulacija i stopa preživljavanja su posmatrane u stadijumu izleganja (48 hpf) u prisustvu (A) GFX (20 μ M), (B) U0126 (U0, 10 μ M), (C) NAC (50 μ M). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost procenta normalnih, deformisanih i koaguliranih embriona u 5 nezavisnih ponavljanja sa 15-20 embriona/grupi.

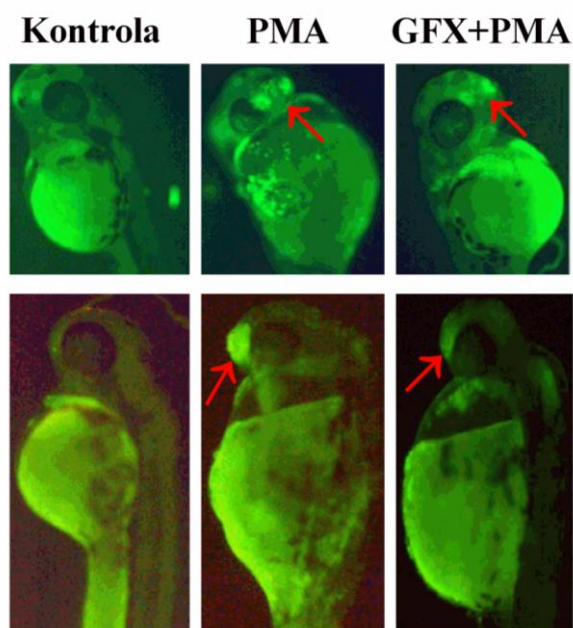


Slika 4.34. Efekat GFX na preživljavanje embriona riba zebrica tretiranih sa PMA.

Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su izlagani inhibitoru GFX, a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf), dodat je PMA (200 $\mu\text{g/L}$), a stopa preživljavanja je praćena tokom izleganja (48 hpf). Rezultati su dobijeni od 5 nezavisnih ponavljanja sa 15-20 embriona/grupi, izraženi su kao procenat od kontrolne grupe i prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. Različita slova iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike između tretiranih grupa ($p < 0,05$).

4.7.7. Efekat inhibicije Pkc na pojavu apoptoze kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA

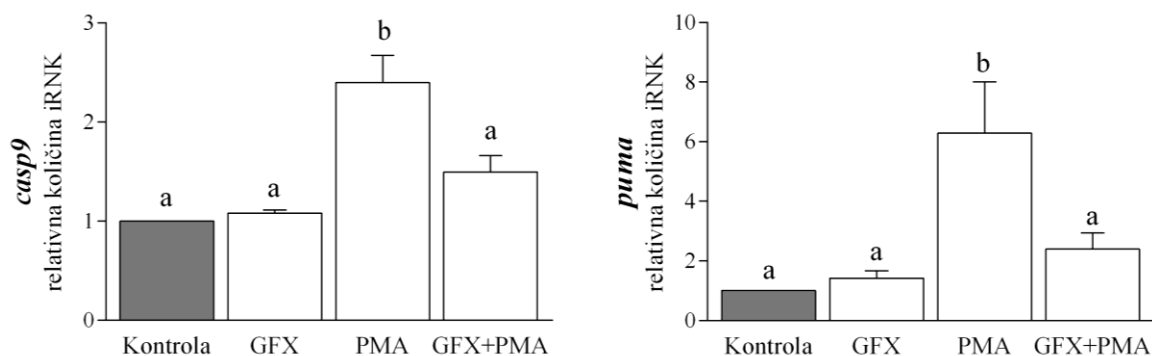
U cilju definisanja uloge Pkc u nastanku apoptoze kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA, embrioni su pretretirani sa GFX (20 μM), a nakon toga je dodat PMA (200 $\mu\text{g/L}$) u trajanju od 24 h. Rezultati su pokazali da GFX dovodi do smanjenja broja apoptotičnih ćelija u moždanoj regiji kod embriona koji su bili izloženi PMA u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 4.35).



Slika 4.35. Efekat GFX na pojavu apoptoze kod embriona riba zebrica izlaganih PMA.
 Embrioni u stadijumu faringule (5 hpf) su izlagani GFX (20 μ M), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf) dodat je PMA (200 μ g/L). Analiza apoptoze je urađena u stadijumu faringule (48 hpf) korišćenjem akridin oranž boje. Crvene strelice pokazuju na apoptotične ćelije. Embrioni su posmatrani u 4 nezavisna ponavljanja sa 10-15 embriona/grupi. Prikazane su reprezentativne slike sa fluorescentnog mikroskopa.

4.7.8. Efekat inhibicije Pkc na eksprimiranje proapoptičnih gena kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA

Inhibicija Pkc aktivacije sprečila je porast eksprimiranja proapoptičnih gena *casp9* i *puma* kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA (Slika 4.36).

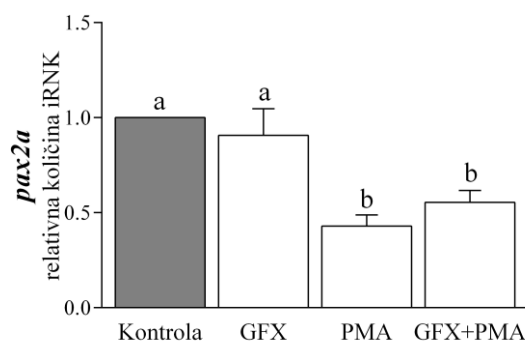


Slika 4.36. Efekat GFX na ekspimiranje proapoptotičnih gena kod embriona riba zebriica tretiranih sa PMA. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su izlagani inhibitoru GFX (20 μ M), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf) dodat je PMA (200 μ g/L). Analiza ekspimiranja *casp9* i *puma* gena je rađena u stadijumu faringule (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 6-8 nezavisnih ponavljanja sa 5 embriona/grupi. Različita slova iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike između tretiranih grupa ($p < 0,05$).

4.7.9. Efekat inhibicije Pkc na ekspimiranje gena *pax2a* kod embriona riba zebriica tretiranih sa PMA

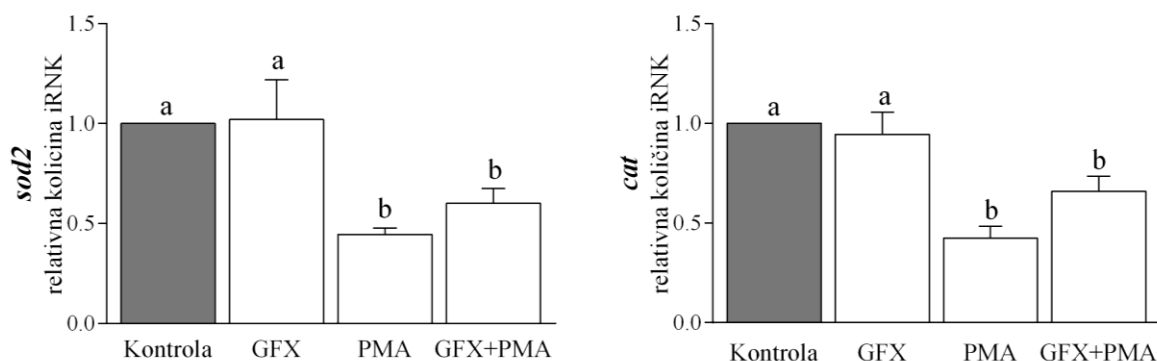
Primena GFX nije sprečila smanjenje ekspimiranja *pax2a* kod embriona riba zebriica tretiranih sa PMA (Slika 4.37).



Slika 4.37. Efekat GFX na ekspimiranje gena *pax2a* kod embriona riba zebriica izloženih PMA. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su izlagani inhibitoru GFX (20 μ M), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf) dodat je PMA (200 μ g/L). Analiza ekspimiranja *pax2a* je rađena u stadijumu faringule (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 6-8 nezavisnih ponavljanja sa 5 embriona/grupi. Različita slova iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike između tretiranih grupa ($p < 0,05$).

4.7.10. Efekat inhibicije Pkc na ekspimiranje gena *sod2* i *cat* kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA

Slično efektu na ekspimiranje *pax2a*, inhibicija Pkc aktivacije nije sprečila smanjeno ekspimiranje *sod2* i *cat* koje je indukovao PMA indukovano kod embriona riba zebrica (Slika 4.38).



Slika 4.38. Efekat GFX na ekspimiranje antioksidativnih gena kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA. Embrioni u stadijumu gastrule (5 hpf) su izlagani inhibitoru GFX (20 μ M), a nakon toga, u stadijumu faringule (24 hpf) dodat je PMA (200 μ g/L). Analiza ekspimiranja gena *sod2* i *cat* je rađena u stadijumu faringule (48 hpf) korišćenjem metode qRT-PCR.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM od 6-8 nezavisnih ponavljanja sa 5 embriona/grupi. Različita slova iznad stubića predstavljaju statistički značajne razlike između tretiranih grupa ($p < 0,05$).

5. DISKUSIJA

Razvoj embriona je kompleksan proces rasta i razvoja oplođene jajne ćelije do višćelijskog organizma. Embriogeneza je kontrolisana od velikog broja faktora među kojima značajnu ulogu igraju signalni putevi. Nesmetano odvijanje signalizacije omogućuje pravilan razvoj organizma, a poremećaji u funkciji pojedinih elemenata signalnih puteva mogu da dovedu do poremećaja u razvoju pojedinih organa i do nastanka oboljenja. Iz tog razloga upoznavanje uloge pojedinih signalnih puteva tokom embriogeneze je od velikog značaja za bolje razumevanje kontrole razvoja organizma.

5.1. Uloga signalnih puteva kinaza Erk i Akt tokom ranog razvoja embriona riba zebrića

U prvom delu ove disertacije ispitivana je uloga Erk i Akt tokom ranog razvoja embriona. U ćelijama adultnih organizama je identifikovano oko 160 proteina koji se mogu aktivirati kinazama ERK. Ti proteini mogu biti transkripcioni faktori koji regulišu gensku transkripciju ili se mogu nalaziti u citoplazmi gde učestvuju u procesima kao što su mitozu, apoptozu i dr. (Ronnstrand, 2004; Wortzel i Seger, 2011; Yao i Seger, 2009; Yoon i Seger, 2006). Takođe je pokazana značajna uloga ovih kinaza u kontroli velikog broja procesa tokom embriogeneze (Hong i sar., 2006; Kelly i sar., 2014; Kim i sar., 2013; Shinya i sar., 2001; Wang i sar., 2005; Zhu i sar., 2008). Značaj signalizacije Akt tokom razvoja riba zebrića je takođe pokazana u većem broju istraživanja (Chen i sar., 2017; Ciarlo i sar., 2017; Finkielstein i Kelly, 2009; Liu i sar., 2008; Schenck i sar., 2008).

Fokus u ovom delu disertacije je stavljen na ispitivanje uloge kinaza Erk i Akt na eksprimiranje gena koji učestvuju u I i II fazi metabolizma ksenobiotika kao i na gene antioksidativne zaštite. Ovi geni su bitni činiooci ćelijskog sistema za detoksifikaciju i zaštitu od izlaganja ksenobioticima. Pored toga Gst superfamilija ima ulogu u održavanju redoks ravnoteže tokom embriogeneze riba zebrića što je značajano za procese ćelijske polarizacije, proliferacije i apoptoze (Sant i sar., 2017). Rezultati u ovoj disertaciji su pokazali da Erk, ali ne i Akt, ima inhibitornu ulogu u eksprimiranju gena *gstp1-2* tokom ranog razvoja embriona riba zebrića. Takođe, inhibicioni efekat Erk je specifičan za *gstp 1-2* i za određen stadijum razvoja. Naime, inhibicija aktivnosti Erk

povećava eksprimiranje *gstp1-2* tokom rane embriogeneze, od stadijuma blastule do izleganja. Već u stadijumu larve (96 hpf), inhibitorno dejstvo Erk na eksprimiranje *gstp1-2* prestaje. Takođe, inhibicija Erk ne remeti eksprimiranje ostalih ispitivanih predstavnika klase Gst, *Alpha* i *Mu*. Istraživanja u ovoj disertaciji su još pokazala da kinaze Erk svoj negativan efekat ispoljavaju na *gstp1* ali ne i na *gstp 2* ukazujući na transkript-specifičnu regulaciju klase Gst *Pi* signalnim putem Erk. Razlog selektivnog delovanja Erk na *gstp1* je trenutno nepoznat. Međutim, kako je pokazano u ovoj disertaciji, eksprimiranje *gstp2* nije bilo vidljivo pomoću metode PCR što može ukazivati na odsustvo transkripcije ovog gena tokom rane faze embriogeneze. Dakle, efekat Erk na *gstp1* se može pripisati činjenici da je transkripcija gena *gstp1* višestruko aktivnija nego *gstp2* tokom rane embriogeneze.

Pored inhibitornog efekta na *gstp1*, pokazano je da Erk negativno deluju i na eksprimiranje *cyp1a*, dok se inhibitorni efekat na eksprimiranje *cyp3a65* ispoljavao tek u stadijumu larve (96 hpf). Ovakvo inhibitorno dejstvo Erk na eksprimiranje gena *CYP*, preventivno *CYP1A*, pokazano je i na sisarskim tumor ćelijskim linijama (Andrieux i sar., 2004). Međutim, u istraživanjima na humanoj ćelijskoj liniji hepatocita pokazano je da povećanje eksprimiranja *CYP1A* nakon tretmana sa U0126 može biti rezultat interakcije ovog farmakološkog inhibitora sa AhR (Bachleda i Dvorak, 2008). Takođe, pokazano je i da inhibicija signalnog puta Erk ima pozitivan uticaj na stabilizaciju AhR što rezultira povećanjem eksprimiranja gena koji zavise od AhR, uključujući i *CYP1A* (Androutsopoulos i sar., 2009). Trenutno nije jasno da li je povećanje eksprimiranja gena *cyp1a* i *cyp3a65* kod embriona riba zebrica posledica sprečene interakcije transkripcionih faktora, koji zavise od Erk, sa promotorskim regionom ovih gena ili direktne interakcije U0126 sa AhR ili povećana stabilizacije AhR. Dalja istraživanja u tom pravcu su neophodna za bolje razumevanje efekta kinaza Erk na eksprimiranje enzima Cyp kod embriona riba zebrica.

Inhibitorni efekat Erk, pre svega na eksprimiranje *gstp1-2*, ukazuju na moguću ulogu ovih kinaza u regulaciji redoks statusa tokom embriogeneze. Naime, kod embriona riba zebrica su pokazane dinamične promene u redoks stanju u prvih 48 hpf. U prvih 18 hpf se zapaža smanjenje GSH i povećanje glutation disulfida, koje zatim prati povećanje GSH koje je posebno izraženo u periodu faringule (Timme-Laragy i sar., 2013). Ove

dinamične promene u redoks stanju embriona su posledice promena u ekspimiranju gena koji učestvuju u sintezi i korišćenju GSH. Pošto Erk reguliše ekspimiranje *gstp1-2* može se pretpostaviti da ove kinaze imaju značajnu ulogu u održavanju redoks stanja tokom rane embriogeneze. Uloga ERK u održavanju redoks ravnoteže i zaštiti od oksidativnog stresa je pokazana i kod adultnih ćelija različitih organizama (Helfenberger i sar., 2018; Patwardhan i sar., 2014; Patwardhan i sar., 2013; Son i sar., 2011; Traore i sar., 2008), a rezultati u ovoj disertaciji prvi put ukazuju na ovu ulogu Erk i tokom razvoja embriona.

Inhibitorna uloga Erk na ekspimiranje *cyp1a* nije dovoljna jasna. *Cyp1a* učestvuje u I fazi metabolizma ksenobiotika i njegova supresija od strane Erk bi sprečila efikasniju detoksifikaciju ksenobiotika kod embriona riba zebrića. Međutim, ekspimiranje *cyp1a* pokazuje dinamičan obrazac tokom rane embriogeneze. Nivo transkripta za ovaj protein je visok tokom 8 hpf, a zatim opada i ostaje na niskom nivou tokom tokom 24 hpf i 48 hpf kada ponovo raste i dostiže pik kod 72 hpf embriona (Glisic i sar., 2016; Saad i sar., 2016). Promena u ekspimiranju gena *cyp1a* je u saglasnosti sa promenama u aktivnosti ovog proteina kod embriona riba zebrića koja nije mogla biti detektovana sve do 72 hpf (Mattingly i sar., 2001). Niski nivoi *cyp1a* tokom rane embriogeneze ukazuju na limitiranu mogućnost biotransformacije ksenobiotika od strane embriona. Zbog specifičnog obrasca ekspimiranja ovog gena može se pretpostaviti da ovaj enzim može da ispoljava i druge uloge u normalnom razvoju embriona. Stoga, moguća uloga Erk bi bila u uspostavljanju dinamičnog obrasca ekspimiranja ovog gena tokom rane embriogeneze omogućavajući neometani razvoj embriona.

Pored definisanja uloga Erk i Akt tokom neometanog razvoja embriona riba zebrića, u ovom delu disertacije su ispitivane i uloge ove dve signalizacije u regulaciji ekspimiranja *gstp1-2* kod embriona riba zebrića tokom oksidativnog stresa. Različiti ksenobiotici mogu da dovedu do oksidativnog stresa i pojave deformiteta kod embriona riba zebrića (Cai i sar., 2012; Gao i sar., 2017; Liu i sar., 2016; Duan i sar., 2013; Massarsky i sar., 2015). Iz razloga zaštite od oksidativnog stresa kod embriona riba zebrića dolazi do povećanja u ekspimiranju *gstp1-2* (Hahn i sar., 2014; Kobayashi i sar., 2002, Kobayashi i sar., 2009; Mills i Gallagher, 2017; Timme-Laragy i sar., 2009). Iz perspektive uloge Erk u regulaciji *gstp1-2* u neometanim uslovima razvoja embriona,

interesantno je bilo videti da li ova kinaza učestvuje u kontroli eksprimiranja *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa. Pokazano je da transkripcioni faktor Nrf2 ima ulogu glavnog regulatora eksprimiranja gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrića tokom oksidativnog stresa izazvanog sa tBHQ (Suzuki i sar., 2005). Pozitivna uloga *nrf2* je pokazana genetičkim brisanjem gena ovog transkripcionog faktora koristeći tehniku morfolino (Kobayashi i sar., 2002). Detaljnijim ispitivanjima ustanovljen je i tačan mehanizam koji dovodi do povećanog eksprimiranja *gstp1-2* kod embriona riba zebrića tretiranih sa tBHQ. Naime, u odsustvu oksidativnog stresa Nrf2 se nalazi u kompleksu sa Keap1 (engl. *Kelch-like ECH associated protein 1*), koji predstavlja specifični adapter za Cul3 ubikvitin ligazu. U bazalnim uslovima Keap1 kontroliše degradaciju Nrf2, međutim tokom oksidativnog stresa jedinjenja koja aktiviraju Nrf2, blokiraju Keap1 dovodeći do stabilizacije Nrf2, njegove jedarne translokacije i eksprimiranja gena koji zavise od Nrf2 (Itoh i sar., 1999; Kobayashi i sar., 2009). Rezultati u ovoj disertaciji su pokazali da inhibicija aktivnosti Erk ili Akt nije remetila povećano eksprimiranje *gstp1-2* kod embriona riba zebrića izloženih tBHQ što može ukazati na odsustvo kontrole ova dva signalna puta u eksprimiranju *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa. Međutim, važno je napomenuti da tBHQ nije doveo do povećanja aktivnosti Erk ili Akt, a takođe smanjenje aktivnosti ovih kinaza nije menjao nivo eksprimiranja *nrf2a*. Nismo ispitivali da li Erk ili Akt mogu da utiču na protein Keap1 ili da fosforilišu Nrf2 protein direktno i na taj način da utiče na stabilnost Nrf2 i promenu eksprimiranja svih gena koji zavise od Nrf2. Međutim, pokazano je da direktna fosforilacija NRF2 od strane kinaza MAPK u sisarskim ćelijama ima ograničen uticaj na regulaciju antioksidativnih odgovora koji zavise od NRF2 (Sun i sar., 2009), tako da je moguće da ova veza nije značajna ni kod embriona riba zebrića. Na osnovu napred iznetog može se pretpostaviti da kinaze Erk igraju važnu ulogu u eksprimiranju *gstp1-2* tokom normalnog razvoja embriona, ali da *nrf2* preuzima glavnu ulogu u regulaciji eksprimiranja ovog enzima tokom oksidativnog stresa izazvanog sa tBHQ. Međutim, tBHQ ne izaziva povećanje aktivnosti Erk ili Akt kod embriona riba zebrića, te se zbog toga ne može sa sigurnošću pretpostaviti da ove dve kinaze ne igraju ulogu u eksprimiranju *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa. Jedan od mogućih pravaca daljeg sagledavanja uloge Erk ili Akt u eksprimiranju *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa bi bio upotreba aktivatora ova dve kinaze, a koji pri tome dovodi do oksidativnog stresa kod embriona riba zebrića. U literaturi postoje podaci da PMA

izaziva oksidativni stres kod embriona riba zebrića (Hermann i sar., 2004; Goody i sar., 2013;) i da aktivira Nrf2 posredstvom aktivacije Pkc (Kobayashi i sar., 2002). Pored ovih efekata, u ovoj disertaciji je pokazano da PMA aktivira Erk i Akt kod embriona riba zebrića. Stoga, PMA predstavlja odličnu supstancu za analizu interakcije između kinaza Erk i Akt i *nrf2* u regulaciji eksprimiranja *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa. Eksperimenti sa PMA su pokazali da Erk ipak ima ulogu u eksprimiranju *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa, a koja nije bila vidljiva u eksperimentima sa tBHQ. Takođe, može se pretpostaviti da regulacija eksprimiranja *gstp1-2* zavisi od intenziteta aktivnosti Erk tokom oksidativnog stresa. Naime, PMA prouzrokuje snažnu aktivaciju Erk i ne dovodi do povećanja eksprimiranja *gstp1-2*, dok tBHQ ne dovodi do povećanja pErk, ali povećava eksprimiranje gena *gstp1-2*. Ovi rezultati mogu da ukažu da je izostanak eksprimiranja *gstp1-2* kod embriona tretiranih sa PMA najverovatnije posledica povećane aktivnosti Erk koja inhibira eksprimiranje ovog gena.

U ovoj disertaciji je dalje identifikovan put preko koga Erk utiče na eksprimiranje gena *gstp1-2*. ERK signalizacija može da aktivira veći broj transkripcionih faktora, kao što su CREB, AP-1, NF- κ B, JUN i FOS, koji su uključeni u regulaciju *GSTP* kod sisarskih ćelija (Chang i sar., 2010; Lo i Ali-Osman, 2007; Tsai i sar., 2010). U jednom istraživanju praćene su promene u eksprimiranju NGF (engl. *nerve growth factor*) gena nakon tretiranja glijalnih humanih ćelija sa PMA i otkriveno je da povećanom eksprimiranju ovog gena prethodi aktiviranje signalizacije Raf, MEK i ERK i prenosa signala do transkripcionog faktora CREB (Davis i sar., 2018). Istraživanja u ovoj disertaciji su pokazala da Creb najverovatnije deluje kao nizvodni faktor u inhibicionom efektu Erk na eksprimiranje *gstp1-2* kod embriona riba zebrića. Rezultati dobijeni nakon tretmana embriona riba zebrića sa forskolinom, potentnim stimulatorom Creb, sugerišu da aktivacija Creb deluje supresivno na eksprimiranje *gstp1-2* kod embriona riba zebrića, vrlo slično efektu koji ispoljavaju kinaze Erk. Uzimajući u obzir i činjenicu da U0126 blokira fosforilaciju Creb u ranim stadijumima razvoja embriona, može se zaključiti da Erk, preko aktivacije Creb, deluje inhibiciono na eksprimiranje *gstp1-2* kod embriona riba zebrića. Tačan mehanizam preko kojeg Creb supresivno deluje na eksprimiranje *gstp1-2* ostaje nepoznat. Koristeći bioinformatičke alatke pokazano je prisustvo CRE-like mesta u promotorskim regionima *gstp1* i *gstp2*, čime se još više dovodi u vezu uključenost Creb u regulaciji eksprimiranja gena *gstp1-2* tokom

ranog embrionalnog razvoja zebrića. Moguće je da CREB deluje preko proteina kao što je inducibilni cAMP rani represor, blokirajući ekspimiranje *gstp1-2* kao što je opisano kod sisara (Fan i sar., 2010).

Na osnovu napred iznetog može se pretpostaviti da Erk i Nrf2 nezavisno regulišu ekspimiranje *gstp1-2* kod embriona riba zebrića tokom oksidativnog stresa. Može se, takođe, pretpostaviti postojanje neke vrste ravnoteže između signalizacije Nrf2 (pozitivna grana) i signalizacije Erk (negativna grana) koja određuje nivo ekspimiranja gena *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa. U slučaju kada fosforilacija Erk nije bila povećana više od bazalnog nivoa, kakva je viđena tokom izlaganja tBHQ, ravnoteža se pomera ka pozitivnoj Nrf2 grani, što omogućava tBHQ da stimuliše ekspimiranje *gstp1-2*. Značajna fosforilacija kinaza Erk, kada su embrioni tretirani sa PMA, dovodi do pomeranja ravnoteže ka negativnoj grani kinaza Erk što dovodi do smanjenja ekspimiranja *gstp1-2*.

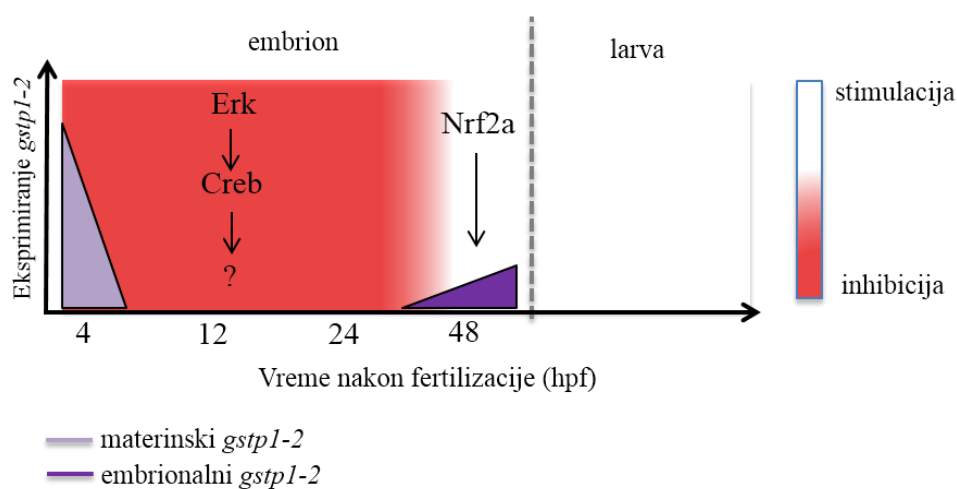
Treba istaći da su podaci iz ove disertacije koji ukazuju na postojanje negativne interakcije između Erk i ekspimiranja gena *gstp1-2* u suprotnosti u odnosu na pozitivnu regulaciju između ove kinaze i *GSTP* opisane kod sisarskih ćelija kao što su hepatoma ćelijska linija - HepG2 (Pae i sar., 2006; R. Yu i sar., 1999; Zipper i Mulcahy, 2000; Zipper i Mulcahy, 2003) mišija alveolarna epitelijalna ćelijska linija - C10 (Papaiahgari i sar., 2004), kancerske ćelije humane prostate - PC-3 (Xu i sar., 2006), mišiji keratociti - PE ćelije (Manandhar i sar., 2007), feohromocitoma pacova - PC12 ćelije (Kim i sar., 2008) ili humane epitelne ćelije dojke - MCF10A (Na i sar., 2008) koristeći tBHQ ili neki drugi tip aktivatora NRF2. Međutim, ovi eksperimentalni modeli imaju malo zajedničkog sa embrionalnim modelom. Na primer, za razliku od adultnih sisarskih ćelija, embrioni riba zebrića imaju dva ortologa sisarskom NRF2 (Nrf2a i Nrf2b). Nrf2b je najviše ekspimiran kod embriona u razvoju i razlikuje se od Nrf2a u nekoliko aspekata, uključujući njegovu ulogu da inhibiše ekspimiranje gena (Timme-Laragy i sar., 2012). Ovi navodi daju potporu rezultatima da Erk-Creb osovina može da utiče drugačije na ekspimiranje *gstp1-2* u odnosu na adultne ćelije. U prilog ovakvoj regulaciji ekspimiranja gena koja je specifična za određeni razvojni period govori i činjenica da inhibicija Erk kod 4 hpf embriona riba zebrića ne utiče na ekspimiranje antioksidativnog gena (*hmox1*), koje je indukovano perfluorooktansulfoničnom

kiselinom i regulisano od strane Nrf2 (Shi i Zhou, 2010). Međutim, pozitivan efekat kinaza ERK na eksprimiranje *Hmox1* je pokazan kod adultnih ćelija pacova PC12 (Kim i sar., 2008). Takođe, rađeno je ispitivanje ponašanja larvalnih i juvenilnih zebrića pri dužem izlaganju (15 i 30 dpf) vodenoj frakciji sirovog ulja i olovu i njihovom uticaju na eksprimiranje *gstp1* i *cyp1a*. Ovo ispitivanje je pokazalo je da eksprimiranje *gstp1* smanjeno u odnosu na kontrolnu grupu, dok se efekat na eksprimiranje *cyp1a* razlikovao kod različitih starosnih grupa zebrića: kod 15 dpf zebrića je došlo do povećanja, a kod 30 dpf do smanjenja eksprimiranja ovog gena u odnosu na kontrolu (Wang i sar., 2018).

Iako rezultati naših istraživanja sugerišu da Erk ispoljava negativnu regulaciju na eksprimiranje *gstp1-2* tokom embriogeneze zebrića, ne može se potpuno isključiti mogućnost da je opaženo povećanje u nivou eksprimiranja *gstp1-2* jednostavno odgovor embriona na oksidativni stres izazvan sa U0126. Međutim, ovaj scenario je malo verovatan pošto tretman sa U0126 specifično utiče na eksprimiranje *gstp1-2*, dok eksprimiranje drugih gena uključenih u zaštitu od oksidativnog stresa, posebno gena za antioksidativne enzime, nije bilo izmenjeno kako je pokazano u ovoj disertaciji. Takođe, u jednom istraživanju pokazano je da farmakološka inhibicija signalnog puta Erk ne dovodi do povećanja formiranja ROS kod 4 hpf embriona riba zebrića (Shi i Zhou, 2010).

Pitanje značaja ove specifične i negativne regulacije eksprimiranja *gstp1-2* preko signalizacije Erk tokom inicijalne faze embriogeneze kod riba zebrića ostaje za sada otvoreno. Podaci o učešću enzima Gst u regulaciji redoks ravnoteže i odbrani organizma od oksidativnog stresa mogli bi da budu polazna osnova za nalaženje odgovora na ovo pitanje. Naime, rani embrionalni razvoj je okarakterisan sa veoma dinamičnim promenama u redoks statusu. Uočene su oscilacije u koncentraciji glutationa i eksprimiranju gena uključenih u sintezu glutationa i njegovo korišćenje (Timme-Laragy i sar., 2013; Glisic i sar., 2016;). Ove fluktuacije su kritične za pravilan razvoj organizma. Interesanto je da geni koji su uključeni u redoks regulaciju i metabolizam ksenobiotika su utišani na samom početku embriogeneze. U tom pogledu pokazano je da eksprimiranje embrionalnog *gstp1-2* raste pri starosti embriona tek od 24 hpf (Glisic i sar., 2016). Ovaj inicijalno nizak nivo eksprimiranja *gstp1-2* se održava uprkos

činjenici da je ekspimiranje gena *nrf2a* poreklom od majke prisutno i da ekspimiranje embrionalnog gena *nrf2a* počinje sa rastom pri starosti embriona od 6 hpf (Williams i sar., 2013). Čini se da Erk pruža neophodan inhibicioni efekat na ekspimiranje *gstp1-2* u ranom periodu embriogeneze, koji se odlikuje sveukupno oksidovanom sredinom i niskim nivoom totalnog GSH (od prelaza iz stadijuma blastule preko somitogeneze, 3-24 hpf) (Timme-Laragy i sar., 2013). Kako razvoj embriona napreduje, regulacija ekspimiranja *gstp1-2* postaje nezavisna od Erk i regulacija sa Nrf2a preuzima dominantnu ulogu, što je u korelaciji sa porastom redukovanih uslova u embrionu (Slika 5.1)



Slika 5.1. Predložen model regulacije *gstp1-2* tokom rane embriogeneze. Uočene su dve tačke regulacije ekspimiranja embrionalnog *gstp1-2*. Nivo ekspimiranja *gstp1-2* je visok od stadijuma zigota do stadijuma blastule (0-4 hpf) usled prisustva materinskog transkripta. U stadijumu gastrule (8 hpf) naglo opada *gstp1-2*. Nakon toga, ekspimiranje *gstp1-2* ostaje na niskom nivou do izleganja (48 hpf), kada počinje da raste i dostiže oko 4,5% nivou koji je bio prisutan kod 0 hpf embriona (Glisic i sar., 2016). Moguće je da je Erk-Creb osovina odgovorna za supresiju *gstp1-2* u stadijumu blastule do izleganja. Nakon izleganja, regulacija *gstp1-2* postaje nezavisna od Erk, a Nrf2a preuzima dominantnu ulogu, što dovodi do povećanja ekspimiranja *gstp1-2* do larvalnog stadijuma.

5.2. Uloga signalnog puta kinaza Pkc tokom ranog razvoja embriona riba zebrica

Dalja istraživanja u ovoj disertaciji su se odnosila na ispitivanje uloge PKC tokom rane embriogeneze. Pokazano je da kinaze PKC regulišu embriogenezu kod mnogih organizama uključujući voćne mušice, morske ježeve, nematode, miševе i gastropode (Cox i sar., 2001; Dickey-Sims i sar., 2005; Gallicano i sar., 1997; Tabuse i sar., 1998;

Wu i sar., 1998; Zukaite i sar., 2016). Kod embriona riba zebrica je pokazano da ovaj signalni put ima ulogu u sinaptičkoj transmisiji (Patteni sar., 2010) i razvoju retine (Link i Cui, 2005) međutim uloga aktivacije ovog signalnog puta u ranoj embriogenezi do sada nije bila istraživana.

U eksperimentima sa PMA, aktivatorom različitih izoformi Pkc, pokazana je negativna uloga aktivacije Pkc signalizacije tokom ranog razvoja embriona riba zebrica. Naime, izlaganje embriona PMA je dovelo do povećanja stope smrtnosti embriona kao i do pojave različitih tipova deformiteta. Međutim, nismo uspjeli da pokažemo aktivaciju Pkc, niti smo uspjeli da odredimo koja izoforma Pkc se aktivira kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA koja je odgovorna za pokazane negativne efekte na razvoj embriona. PMA aktivira nekoliko vrsta PKC uključujući klasične izoforme PKC (PKC α , PKC β i PKC γ) i nove izoforme PKC (PKC δ , PKC ϵ , PKC η i PKC θ) (Castagnag i sar., 1982; Nidel i sar., 1983; Rybin i sar., 1999; Cohen i sar., 2006). Međutim, koje tačno izoforme Pkc se aktiviraju i u kojim ćelijama kod embriona riba zebrica tretiranih sa PMA i dalje ostaje nepoznanica. Dosadašnja istraživanja su pokazala prisustvo Pkc γ , Pkc β II, Pkc δ , Pkc ϵ , Pkc θ i Pkc ζ u nervnom sistemu i Pkc α u neuronima trigeminalne ganglije, dorzalnog delu kičmene moždine i kičmenim ganglionima embriona riba zebrica (Patten i sar., 2007; Slatter i sar., 2005). Takođe, novija istraživanja ukazuju na prisustvo atipičnih izoformi Pkc kod embriona riba zebrica (Raman i sar., 2016) međutim one se ne aktiviraju sa PMA.

Prisutnost izoformi PKC koje se mogu aktivirati sa PMA u mozgu embriona riba zebrica kao i ulogu ove supstance u apoptozi adultnih ćelija (Taylor i sar., 2003; Ruben i sar., 2000; Park i sar., 2001; Meng i sar., 2001) su naveli dalja istraživanja u tom pravcu. Rezultati u ovoj disertaciji ukazuju da (i) izlaganje embriona PMA dovodi do apoptoze i (ii) da se apoptoza javlja u delovima embriona riba zebrica u kojima se nalaze pojedine izoforme Pkc – oko očnog regiona. Izoforma Pkc α je detektovana u grupi neurona u okolini i u kaudalnoj očnoj regiji u blizini trigeminalnog ganglionu kod riba zebrica (Slatter i sar., 2005). Sasvim je moguće da PMA aktivira Pkc α i da aktivacija ove kinaze dovodi do apoptoze u nervnim ćelijama trigeminalne ganglije. U prilog ovim rezultatima pokazano je da hiperaktivacija Pkc tokom ranog razvoja dovodi do raznih patoloških pojava kao što su zastoj u razvoju, manja veličina glave i očiju,

remećenje razvoja prednjeg i zadnjeg mozga, motorne abnormalnosti i preuveličan odgovor na stres (Liu i sar., 2018). U svetlu ovih činjenica nije možda ni iznenađujuće da aktivacija Pkc u nervnom sistemu dovodi do smanjenje stope preživljavanja. Međutim, sasvim je moguće da PMA aktivira i neke druge izoforme Pkc koje se nalaze u drugim ćelijama kod embriona riba zebrića dovodeći do negativnog efekta na preživljavanje i na razvoj embriona.

Analiza apoptotičnih gena kao i markera neuralnog i moždanog razvoja, potvrđuju pojavu apoptoze u mozgu i kod embriona riba zebrića nakon izlaganja PMA. Naime, izlaganje PMA povećava eksprimiranje nekoliko apoptotičnih gena, kao što su *casp 9* i *puma*. Kaspaze su velika familija proteinaza koje igraju značajnu ulogu u procesu apoptoze. Kaspaza 9 se aktivira kad napravi kompleks sa dATP i Apaf-1 (Pyati i sar., 2007). Ovaj kompleks dalje aktivira nizvodne kaspaze, kao što je kaspaza 3. Puma je ciljani protein transkripcionog faktora p53, koji je brzo indukovano tokom stresa, što dalje vodi u apoptozu (Yu i Zhang, 2008). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je pozitivna regulacija (engl. *up-regulation*) *casp9* i *puma* kod embriona riba zebrića neophodna za pojavu apoptoze (Kratz i sar., 2006; Zhou i sar., 2015) što takođe potvrđuju i nalazi u ovoj disertaciji o povezanosti između povećanja eksprimiranja ova dva proapoptična gena i pojave apoptoze kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA. Takođe, u jednom istraživanju pokazano je da povećanje eksprimiranja gena povezanih sa procesom apoptoze: *p53*, *puma*, *bax*, *apaf-1*, *casp9* i *casp3* u škrigama šarana izloženih insekticidu hlorspirifosu je praćeno pojavom apoptoze (Jiao i sar., 2019). Međutim, u ovoj disertaciji nismo uspjeli da pokažemo povećano eksprimiranje *casp 9* i *puma* u mozgu embriona riba zebrića što bi dalo značajniju potvrdu pojavi apoptotičnih procesa u ovom organu nakon tretmana sa PMA.

Zajedno sa promenama u eksprimiranju *casp9* i *puma*, uočen je pad u eksprimiranju *pax2a*, što ukazuje na promene u razvoju optičke stabljike, granice između srednjeg i zadnjeg mozga, optičke vezikule i neurona kičmene moždine. Međutim, eksprimiranje markera nervnih stem/progenitorskih ćelijskih markera (*ngn1*, *sox2* i *sox3*), velikog mozga (*emx1*), srednjeg mozga (*otx2*) i markera formiranja sinapsi (*syn2a*) nisu bili značajno izmenjeni nakon tretmana sa PMA. Na osnovu ovog rezultata čini se da su samo pojedini delovi mozga i nervnog sistema pod uticajem delovanja PMA. To se

može objasniti činjenicom da su izoforme Pkc detektovane samo u određenim regionima mozga, te da aktivacija Pkc, u tim ćelijama dovodi do pojave apoptoze. Sa druge strane, delovi nervnog sistema koji nemaju prisutne izoforme Pkc su zaštićeni od delovanja PMA. Takođe, drugi razlog različite eksprimiranosti pojedinih markera razvoja mozga i nervnog sistema može ležati i u činjenici da je izlaganje embriona riba zebrića sa aktivatorom Pkc započeto pri starosti embriona od 24 hpf te je sasvim moguće da se razvoj pojedinih delova nervnog sistema, uključujući razvoj prednjeg i srednjeg mozga, sinapsi i drugih odvijao normalno do trenutka dodavanja PMA i da je samo ova supstanca prouzrokovala apoptozu bez uticaja na razvoj gore pomenutih delova nervnog sistema. Interesantan podatak se može pronaći u nekoliko istraživanja koja su imala za cilj da razotkriju koji vremenski okvir, od početka postavke tretmana i njegovog trajanja, je najpogodniji za ispitivanje eksprimiranja određenih gena, s obzirom na moguće postojanje rane smrtnosti (engl. *early "mortality wave"*) embriona u određenim uslovima. (Ali i sar., 2011; Fraysse i sar., 2006). Rezultati su pokazali da u ranijim uzrasnim stadijumima (4 - 24 hpf) dolazi do eksprimiranja većeg broja istih gena kao odgovor na delovanje različitih hemikalija, dok se kod starijih uzrasta (24 - 48 hpf i 96 - 120 hpf) javlja veća specifičnost odgovora i manje preklapanje u eksprimiranju gena. Pretpostavlja se da u periodu do 24 hpf različite hemikalije imaju sličan profil eksprimiranja gena, a da sa druge strane u tom periodu ne dolazi do eksprimiranja gena koji su odgovorni za specifične funkcije pojedinih organa, obzirom da organogeneza nije završena. Stoga se može pretpostaviti da bi izbor početka tretmana 24 hpf, pored izbegavanja mogućnosti rane smrtnosti embriona omogućio i specifičniji odgovor embriona na izloženost datoj hemikaliji u odnosu na izlaganje neposredno po fertilizaciji. Ovakvo objašnjenje bi moglo da bude jedan od razloga specifičnosti efekta PMA na markere neuralnog i moždanog razvoja. PMA je dodat kod 24 hpf embriona i zbog starosti embriona njegovo delovanje bi bilo više specifično što rezultati u ovoj disertaciji i potvrđuju. Međutim, kasnije izlaganje odabranoj hemikaliji može da isključi njen potencijalni toksični efekat u najranijim fazama razvoja, u periodu gastrulacije i segmentacije (Ali i sar., 2011; Yang i sar., 2007).

Iz napred navedenih rezultata je evidentno da izlaganje embriona riba zebrića PMA dovodi do različitih negativnih efekata na rani razvoj embriona, međutim PMA može da aktivira veći broj signalnih puteva koji mogu biti odgovorni za njegove efekte. Podaci iz

ove disertacije su pokazali, na primer, da PMA dovodi do smanjenja u eksprimiranju gena *sod2* i *cat* što ukazuju na moguće prisustvo oksidativnog stresa kod embriona riba zebrića. Pojava oksidativnog stresa je često povezana sa nastankom apoptoze. Tako je pokazano da nanopartikule bakar oksida (Ganesan i sar., 2016) i cihalofop-butila (Zhu i sar., 2015) uzrokuju oksidativni stres i dovode do apoptotičnih procesa kod embriona riba zebrića. Međutim, u literaturi se mogu naći i primeri da oksidativni stres ne dovodi do apoptoze kod embriona riba zebrića. Zračenje embriona sa ugljenikovim jonima je pokazalo pojavu apoptoze i promenu u eksprimiranju apoptotičnih gena, a da nije dovelo do promena u stvaranju ROS (Zhou i sar., 2015). Takođe, u ovoj disertaciji je pokazano da PMA dovodi i do aktivacije signalizacije Erk kod embriona riba zebrića koja je uključena u regulaciju eksprimiranja gena I i II faze metabolizma ksenobiotika, kao i na mnoge druge važne procese vezane za razvoj embriona (Davis i sar., 2018; Hong i sar., 2006; Kelly i sar., 2014). Stoga je sasvim moguće da pojava oksidativnog stresa ili snažna aktivacija kinaza Erk može da dovede do negativnih posledica na razvoj embriona nakon njihovog izlaganja PMA. Eksperimenti sa farmakološkim inhibitorima signalnih puteva Pkc, Erk i ROS su pružili važne informacije o ulogama pojedinih signalnih puteva u negativnom delovanju PMA na rani embrionalni razvoj. Na osnovu tih rezultata može se zaključiti da je aktivacija signalnog puta Pkc odgovorna za povećanu smrtnost embriona, povećano eksprimiranje gena *puma* i *casp9* kao i pojavu apoptotičnih procesa u mozgu kod embriona riba zebrića. Međutim, aktivacija Pkc nije odgovorna za pojavu deformiteta kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA. Sa druge strane, signalizacije ROS i Erk nisu odgovorne za negativne efekte koji su izazvani tretiranjem embriona riba zebrića sa PMA. Naime, izlaganje embriona NAC, hvataču ROS, i U0126, inhibitoru Erk, nije sprečilo pojavu negativnih efekata kod embriona riba zebrića nakon tretmana sa PMA, odnosno nije zapaženo poboljšanje stope preživljavanja embriona i nije bila sprečena apoptoza i pojava deformiteta.

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti uloga signalnog puta Pkc tokom ranog razvoja embriona riba zebrića. Bazalni nivo aktivnosti Pkc tokom rane embriogeneze verovatno omogućava normalni razvoj embriona, dok prekomerna aktivacija ovog signalnog puta dovodi do pojave apoptoze i povećane smrtnosti, ali ne dovodi do pojave deformiteta kod embriona. Slična, apoptotična uloga signalizacije PKC nakon aktivacije sa PMA je pokazana i kod na adultnim ćelijama čoveka, miša i

pacova (Li i sar., 1999; Mhaidat i sar., 2014). Sa druge strane, pokazano je da aktivacija signalizacije PKC nije isključivo povezana sa apoptozom već može da kontroliše vrlo različite procese kod adultnih ćelija uključujući razvoj tumora, ćelijsku transformaciju, rast, diferencijaciju, kao i eksprimiranje mnogih gena (Liu i Heckman, 1998). Moguće je da se istovremena i globalna aktivacija Pkc kakva je dobijena nakon primene PMA dovodi do apoptoze i povećane smrtnosti embriona, međutim ostaje da se ispita uloga pojedinačnih izoformi Pkc koje bi mogle da ispoljavaju potpuno druge efekte tokom ranog razvoja embriona.

Dalje, ostaje i pitanje koji signalni putevi dovode do deformiteta kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA. Pokazano je da tretiranje embriona velikog puža sa PMA dovodi do pojave deformisanih embriona sa ometenim rasporedom tkiva i isturenim žumančanim ćelijama (Zukaite i sar., 2016), potvrđujući da su deformiteti embriona jedna od toksičnih manifestacija delovanja PMA. Iz rezultata ove disertacije može se zaključiti da razvojni deformiteti kod embriona riba zebrića koji su bili izloženi PMA nisu vezani za aktivaciju Pkc, Erk ili ROS već su posledica aktivacije nekih drugih signalnih puteva. Pojedina istraživanja su pokazala da PMA može da aktivira druge signalne puteve kao što su signalni putevi koji uključuju kalcijum (Lagast i sar., 1984) ili da aktivira zapaljenske procese (Dzietko i sar., 2015). Promene u ovim signalnim putevima mogu da prouzrokuju abnormalnosti kod embriona riba zebrića (Andersen i sar., 2015; Duan i sar., 2016), što ukazuje da su deformiteti kod embriona riba zebrića koji su bili izloženi PMA verovatno posledica aktivacije nekih drugih signalnih puteva koji nisu bili detektovani u ovoj disertaciji.

Sveukupno, rezultati u ovoj disertaciji su pokazali uloge Erk, Akt, Pkc signalizacije tokom ranog razvoja embriona riba zebrića. Značaj Erk se ogleda u regulaciji eksprimiranja gena *gstp1-2* i *cyp1a* koji pripadaju grupi enzima koji učestvuju u I i II fazi metabolizma ksenobiotika kao i u regulaciji redoks stanja u organizmu u bazalnim uslovima i tokom oksidativnog stresa. Aktivacija većeg broja izoformi Pkc ima negativnu ulogu tokom ranog razvoja embriona, dovodeći do poremećaja u razvoju embriona koji se ogleda u pojavi apoptoze i porastu smrtnosti embriona. Ovi rezultati mogu doprineti boljem razumevanju kontrole ranog razvoja embriona ali i sagledavanju mehanizama preko kojih pojedini faktori sredine mogu da utiču na embriogenezu.

Naime, tokom embrionalnog razvoja embrioni mogu biti izloženi velikom broju različitih faktora sredine uključujući razne metaboličke faktore, hemikalije i dr. Hemikalije koje menjaju aktivnost kinaza Erk ili dovode do globalne aktivacije Pkc tokom ranog embrionalnog razvoja bi potencijalno mogle da dovedu do negativnih posledica po razvoj embriona.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva istraživanja, dobijenih rezultata i diskusije sa dostupnim podacima može se zaključiti sledeće:

- Kinaze Erk deluju inhibitorno na eksprimiranje gena *gstp1-2* i *cyp1a* kod embriona i larvi riba zebrića i na eksprimiranje *cyp3a65* samo kod larvi riba zebrića. Kinaze Erk i Akt nisu uključene u regulaciju eksprimiranja izoformi enzima Gst klasa *Alpha* i *Mu*, kao ni u regulaciju eksprimiranja gena za antioksidativne enzime. Erk specifično inhibiše eksprimiranje gena *gstp1*, ali ne i *gstp2*.
- Kinaze Erk deluju inhibitorno na eksprimiranje gena *gstp1-2* tokom oksidativnog stresa kod embriona riba zebrića. Povećanje aktivnosti Erk tokom oksidativnog stresa spečava pozitivan efekat transkripcionog faktora Nrf2a na eksprimiranje gena *gstp1-2* kod embriona riba zebrića.
- Aktivacija signalizacije cAMP/Pka/Creb pokazuje inhibitorni efekat na eksprimiranje gena *gstp1-2* tokom ranog razvoja embriona riba zebrića. Signalni put kinaza Erk deluje inhibitorno na eksprimiranje gena *gstp1-2*, putem aktivacije transkripcionog faktora Creb. Identifikovana su vezna mesta za Creb u promotorskom regionu gena *gstp1-2* kod riba zebrića, posredstvom kojih osovina Erk/Creb može da inhibiše eksprimiranje gena *gstp1-2*.
- Signalizacija Erk/Creb preko inhibicije eksprimiranja gena *gstp1* učestvuje u kontroli redoks ravnoteže tokom embriogeneze ribe zebriće.
- Primena PMA tokom rane embriogeneze prouzrokuje povećanu stopu smrtnosti, pojavu različitih vrsta deformiteta i apoptozu u moždanoj regiji kod embriona riba zebrića. Pojava apoptoze je posledica povećanog eksprimiranja proapoptotičnih gena *puma* i *casp9*. Smanjenje eksprimiranja gena *pax2* kod embriona riba zebrića tretiranih sa PMA ukazuje na poremećaje u razvoju optičke stabljike, granice između srednjeg i zadnjeg mozga, optičke vezikule i neurona kičmene moždine.
- PMA dovodi do smanjenja u eksprimiranju gena *sod2* i *cat*, što ukazuje na moguće prisustvo oksidativnog stresa kod embriona riba zebrića.

- Signalizacija Pkc je odgovorna za povećanu stopu smrtnosti, pojavu apoptoze i povećano eksprimiranje apoptotičnih gena, ali nije odgovorna za nastanak deformiteta i smanjeno eksprimiranje antioksidativnih gena kod embriona i larvi ribe zebrice nakon tretmana sa PMA.
- Aktivacija većeg broja izoformi Pkc pokazuje negativan efekat tokom ranog razvoja embriona, koji se ogleda u pojavi apoptoze i porastu smrtnosti embriona.

7. LITERATURA

- Abu-Elmagd, M., Ishii, Y., Cheung, M., Rex, M., Le Rouëdec, D., Scotting, P. J. (2001). cSox3 Expression and Neurogenesis in the Epibranchial Placodes. *Developmental Biology*, 237(2), 258–269. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0378>
- Adamska, M., Degnan, S. M., Green, K. M., Adamski, M., Craigie, A., Larroux, C., Degnan, B. M. (2007). Wnt and TGF- β Expression in the Sponge Amphimedon queenslandica and the Origin of Metazoan Embryonic Patterning. *PLoS ONE*, 2(10), e1031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001031>
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M., Cook, J. L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26071–26078. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473555>
- Alam, J., Camhi, S., Choi, A. M. K. (1995). Identification of a Second Region Upstream of the Mouse Heme Oxygenase-1 Gene That Functions as a Basal Level and Inducer-dependent Transcription Enhancer. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 11977–11984. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.20.11977>
- Ali, S., Mil, H. G. J. van, Richardson, M. K. (2011). Large-Scale Assessment of the Zebrafish Embryo as a Possible Predictive Model in Toxicity Testing. *PLoS ONE*, 6(6), e21076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021076>
- Alsop, D., Vijayan, M. M. (2009). Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 153(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.12.008>
- Amores, A., Force, A., Yan, Y. L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., ... Postlethwait, J. H. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5394), 1711–1714. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9831563>
- Amsterdam, A., Hopkins, N. (2006). Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends in Genetics*, 22(9), 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.06.011>
- Andermann, P., Ungos, J., Raible, D. W. (2002). Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Developmental Biology*, 251(1), 45–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413897>

- Andersen, N. D., Ramachandran, K. V., Bao, M. M., Kirby, M. L., Pitt, G. S., Hutson, M. R. (2015). Calcium signaling regulates ventricular hypertrophy during development independent of contraction or blood flow. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 80, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.12.016>
- Andreasen, E. A., Spitsbergen, J. M., Tanguay, R. L., Stegeman, J. J., Heideman, W., Peterson, R. E. (2002). Tissue-Specific Expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in Zebrafish Embryos and Larvae: Effects of Developmental Stage and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Exposure. *Toxicological Sciences*, 68(2), 403–419. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.2.403>
- Andrieux, J., Demory, J.-L., Dupriez, B., Quief, S., Plantier, I., Roumier, C., ... Kerckaert, J.-P. (2004). Dysregulation and overexpression of HMGA2 in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 39(1), 82–87. <https://doi.org/10.1002/gcc.10297>
- Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., Spandidos, D. A. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 9, 187. doi: 10.1186/1471-2407-9-187
- Ankley, G. T., Johnson, R. D. (2004). Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR Journal*, 45(4), 469–483. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454686>
- Asojo, O. A., Homma, K., Sedlacek, M., Ngamelue, M., Goud, G. N., Zhan, B., ... Hotez, P. J. (2007). X-ray structures of Na-GST-1 and Na-GST-2 two glutathione s-transferase from the human hookworm *Necator americanus*. *BMC Structural Biology*, 7(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-42>
- Bachleda, P., Dvorák, Z. (2008). Pharmacological inhibitors of JNK and ERK kinases SP600125 and U0126 are not appropriate tools for studies of drug metabolism because they activate aryl hydrocarbon receptor. *General Physiology and Biophysics*, 27(2), 143–145. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645229>
- Bair, S. R., Mellon, S. H. (2004). Deletion of the Mouse P450c17 Gene Causes Early Embryonic Lethality. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5383–5390. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5383-5390.2004>

- Bani-Yaghoub, M., Tremblay, R. G., Lei, J. X., Zhang, D., Zurakowski, B., Sandhu, J. K., ... Sikorska, M. (2006). Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Developmental Biology*, 295(1), 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.007>
- Bansode, R. R., Leung, T., Randolph, P., Williams, L. L., Ahmedna, M. (2013). Cinnamon extract inhibits angiogenesis in zebrafish and human endothelial cells by suppressing VEGFR1, VEGFR2, and PKC-mediated MAP kinase. *Food Science Nutrition*, 1(1), 74–82. <https://doi.org/10.1002/fsn3.13>
- Bekhite, M. M., Finkensieper, A., Binas, S., Muller, J., Wetzker, R., Figulla, H.-R., ... Wartenberg, M. (2011). VEGF-mediated PI3K class IA and PKC signaling in cardiomyogenesis and vasculogenesis of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 124(11), 1819–1830. <https://doi.org/10.1242/jcs.077594>
- Belousov, L. V. (2011). Scott F. Gilbert—Developmental Biology, 2010, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA Ninth Edition. *Russian Journal of Developmental Biology*, 42(5), 349–349. <https://doi.org/10.1134/S1062360411050043>
- Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F., Forte, M. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(2), 112–117. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166569>
- Bhaskar, P. T., Hay, N. (2007). The Two TORCs and Akt. *Developmental Cell*, 12(4), 487–502. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.020>
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., Strähle, U. (1997). The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*, 124(22), 4557–4569. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409673>
- Blader, P., Plessy, C., Strähle, U. (2003). Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development*, 120(2), 211–218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559493>

- Blanchette, B. N., Singh, B. R. (2007). A high pressure liquid chromatography-based assay for glutathione-S-transferase class distinction assay. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(5), 761–765.
<https://doi.org/10.1016/J.JBBM.2007.04.005>
- Bock-Marquette, I., Shrivastava, S., Pipes, G. C. T., Thatcher, J. E., Blystone, A., Shelton, J. M., ... DiMaio, J. M. (2009). Thymosin beta4 mediated PKC activation is essential to initiate the embryonic coronary developmental program and epicardial progenitor cell activation in adult mice in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(5), 728–738.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19358334>
- Brammell, B. F., Wigginton, A. J. (2010). Differential Gene Expression in Zebrafish (*Danio rerio*) Following Exposure to Gaseous Diffusion Plant Effluent and Effluent Receiving Stream Water. *American Journal of Environmental Sciences*, 6(3), 286–294. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2010.286.294>
- Brand, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Beuchle, D., Lun, K., Furutani-Seiki, M., ... Nüsslein-Volhard, C. (1996). Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, 123, 179–190. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007239>
- Brannen, K. C., Charlap, J. H., Lewis, E. M. (2013). Zebrafish teratogenicity testing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 947, 383–401.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-131-8_28
- Bravo, R., Macdonald-Bravo, H. (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *The Journal of Cell Biology*, 105(4), 1549–1554.
<https://doi.org/10.1083/jcb.105.4.1549>
- Brazil, D. P., Park, J., Hemmings, B. A. (2002). PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell*, 111(3), 293–303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419241>
- Brison, D. R., Schultz, R. M. (1997). Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biology of Reproduction*, 56(5), 1088–1096
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160705>

- Cai, G., Zhu, J., Shen, C., Cui, Y., Du, J., Chen, X. (2012). The Effects of Cobalt on the Development, Oxidative Stress, and Apoptosis in Zebrafish Embryos. *Biological Trace Element Research*, 150(1–3), 200–207.
<https://doi.org/10.1007/s12011-012-9506-6>
- Cantley, L. C. (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*, 296(5573), 1655–1657. <https://doi.org/10.1126/science.296.5573.1655>
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., ... Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, 21(13), 2933–2942.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti473>
- Castagnag, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizukag, Y. (1982). Direct Activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters. *The journal of biological chemistry*, 257(13), 7847-7851. <http://www.jbc.org/content/257/13/7847.long>
- Catts, V. S., Shannon Weickert, C. (2012). Gene Expression Analysis Implicates a Death Receptor Pathway in Schizophrenia Pathology. *PLoS ONE*, 7(4), e35511.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035511>
- Chang, H. C., Chen, H.-W., Tung, H.-S., Liu, K.-L., Tsai, C.-W., Lii, C.-K. (2010). Butein Up-Regulates the Expression of the π Class of Glutathione S -Transferase in Rat Primary Hepatocytes through the ERK/AP-1 Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 8994–9000. <https://doi.org/10.1021/jf1014439>
- Chen, S., Liu, Y., Rong, X., Li, Y., Zhou, J., Lu, L. (2017). Neuroprotective Role of the PI3 Kinase/Akt Signaling Pathway in Zebrafish. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 21.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00021>
- Chen, S., Operaña, T., Bonzo, J., Nguyen, N., Tukey, R. H. (2005). ERK kinase inhibition stabilizes the aryl hydrocarbon receptor: implications for transcriptional activation and protein degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4350–4359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411554200>
- Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., Sokol, K., Shiyanova, T., ... Hay, N. (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes Development*, 15(17), 2203–2208.
<https://doi.org/10.1101/gad.913901>

- Chi, N., Epstein, J. A. (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends in Genetics*, 18(1), 41–47.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02594-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02594-X)
- Chico, R. M., Pittrof, R., Greenwood, B., Chandramohan, D. (2008). Azithromycin-chloroquine and the intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy. *Malaria Journal*, 7(1), 255. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-255>
- Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F., Birnbaum, M. J. (2001). Akt1/PKB α Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38349–38352.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C100462200>
- Choudhary, D., Jansson, I., Stoilov, I., Sarfarazi, M., Schenkman, J. B. (2005). Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1–4) during development and in different adult tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 436(1), 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.02.001>
- Ciarlo, C., Kaufman, C. K., Kinikoglu, B., Michael, J., Yang, S., D'Amato, C., ... Zon, L. I. (2017). A chemical screen in zebrafish embryonic cells establishes that Akt activation is required for neural crest development. *ELife*, 6.
<https://doi.org/10.7554/eLife.29145>
- Claudiel, T., Cretenet, G., Saumet, A., Gachon, F. (2007). Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Letters*, 581(19), 3626–3633.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.009>
- Cohen, A., Brodie, C., Sarid, R. (2006). An essential role of ERK signalling in TPA-induced reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of General Virology*, 87, 795–802. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81619-0>
- Colussi, P. A., Kumar, S. (1999). Targeted disruption of caspase genes in mice: What they tell us about the functions of individual caspases in apoptosis. *Immunology and Cell Biology*, 77(1), 58–63. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00788.x>
- Cox, D. N., Seyfried, S. A., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (2001). Bazooka and atypical protein kinase C are required to regulate oocyte differentiation in the Drosophila ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14475–14480. <https://doi.org/10.1073/pnas.261565198>

- Cryns, V., Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes Development*, 12(11), 1551–1570. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620844>
- Cudd, T. A. (2005). Animal Model Systems for the Study of Alcohol Teratology. *Experimental Biology and Medicine*, 230(6), 389–393. <https://doi.org/10.1177/15353702-0323006-06>
- D’Costa, A., Shepherd, I. T. (2009). Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish*, 6(2), 169–177. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0562>
- Davis, J. B., Calvert, V., Roberts, S., Bracero, S., Petricoin, E., Couch, R. (2018). Induction of nerve growth factor by phorbol 12-myristate 13-acetate is dependent upon the mitogen activated protein kinase pathway. *Heliyon*, 4(5), e00617. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00617>
- Dee, C. T., Hirst, C. S., Shih, Y.-H., Tripathi, V. B., Patient, R. K., Scotting, P. J. (2008). Sox3 regulates both neural fate and differentiation in the zebrafish ectoderm. *Developmental Biology*, 320(1), 289–301. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.05.542>
- Deng, C., Liu, G. (2017). British biomedical bulletin. In *British Biomedical Bulletin* (Vol. 5). <http://www.imedpub.com/articles/the-pi3kakt-signalling-pathway-plays-essential-roles-in-mesenchymal-stem-cells.php?aid=18951>
- Depeille, P., Cuq, P., Mary, S., Passagne, I., Evrard, A., Cupissol, D., Vian, L. (2004). Glutathione S-Transferase M1 and Multidrug Resistance Protein 1 Act in Synergy to Protect Melanoma Cells from Vincristine Effects. *Molecular Pharmacology*, 65(4), 897–905. <https://doi.org/10.1124/mol.65.4.897>
- Despic, V., Neugebauer, K. M. (2018). RNA tales - how embryos read and discard messages from mom. *Journal of Cell Science*, 131(5), jcs.201996. <https://doi.org/10.1242/jcs.201996>
- Dickey-Sims, C., Robertson, A. J., Rupp, D. E., McCarthy, J. J., Coffman, J. A. (2005). Runx-dependent expression of PKC is critical for cell survival in the sea urchin embryo. *BMC Biology*, 3(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-18>
- Djukic, M., Ninkovic, M., Jovanovic, M. (2008). OXIDATIVE STRESS – CLINICAL DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE. *Journal of Molecular Biology*, 27, 409–425. <https://content.sciendo.com/view/journals/jomb/27/4/article-p409.xml>

- Dong, S.-C., Sha, H.-H., Xu, X.-Y., Hu, T.-M., Lou, R., Li, H., ... Feng, J. (2018). Glutathione S-transferase π : a potential role in antitumor therapy. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 3535–3547. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S169833>
- Dong, W., Teraoka, H., Tsujimoto, Y., Stegeman, J. J., Hiraga, T. (2004). Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in Mesencephalic Circulation Failure and Apoptosis in Zebrafish Embryos Exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *Toxicological Sciences*, 77(1), 109–116. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh023>
- Dressler, G. R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H. O., Gruss, P. (1990). Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development (Cambridge, England)*, 109(4), 787–795. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1977574>
- Duan, J., Yu, Y., Li, Y., Li, Y., Liu, H., Jing, L., ... Sun, Z. (2016). Low-dose exposure of silica nanoparticles induces cardiac dysfunction via neutrophil-mediated inflammation and cardiac contraction in zebrafish embryos. *Nanotoxicology*, 10(5), 575–585. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1102981>
- Dzietko, M., Hahnemann, M., Polley, O., Sifringer, M., Felderhoff-Mueser, U., Bühner, C. (2015). Effects of PMA (PHORBOL-12-MYRISTATE-13-ACETATE) on the Developing Rodent Brain. *BioMed Research International*, 2015, 318306. <https://doi.org/10.1155/2015/318306>
- Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D. W., Mizrahi, M., Forman, M. S., ... Birnbaum, M. J. (2005). Role for Akt3/Protein Kinase B in Attainment of Normal Brain Size. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1869–1878. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005>
- EEC. (1986). Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.
- EEC. (2010). DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 33–79.

- Eimon, P. M. (2014). Studying Apoptosis in the Zebrafish. *Methods in Enzymology*, 544, 395-431. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417158-9.00016-9>
- Eimon, P. M., Ashkenazi, A. (2010). The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. *Apoptosis*, 15(3), 331–349. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0432-9>
- Ekins, S., Stresser, D. M., Andrew Williams, J. (2003). In vitro and pharmacophore insights into CYP3A enzymes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(4), 161–166. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00049-X)
- Fan, C.-Y., Cowden, J., Simmons, S. O., Padilla, S., Ramabhadran, R. (2010). Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(1), 91–98. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2009.04.065>
- Favaro, R., Valotta, M., Ferri, A. L. M., Latorre, E., Mariani, J., Giachino, C., ... Nicolis, S. K. (2009). Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nature Neuroscience*, 12(10), 1248–1256. <https://doi.org/10.1038/nn.2397>
- Feng, X., Zhang, J., Smuga-Otto, K., Tian, S., Yu, J., Stewart, R., Thomson, J. A. (2012). Protein Kinase C Mediated Extraembryonic Endoderm Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, 30(3), 461–470. <https://doi.org/10.1002/stem.1018>
- Ferri, A. L. M., Cavallaro, M., Braida, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., ... Nicolis, S. K. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131(15), 3805–3819. <https://doi.org/10.1242/dev.01204>
- Finkielsztejn, A., Kelly, G. M. (2009). Altering PI3K-Akt signalling in zebrafish embryos affects PTEN phosphorylation and gastrulation. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 101(11), 661–678, 4 p following 678. <https://doi.org/10.1042/BC20090034>
- Fraysse, B., Mons, R., Garric, J. (2006). Development of a zebrafish 4-day embryol larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(2), 253–267. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.015>

- Friling, R. S., Bensimon, A., Tichauer, Y., Daniel, V. (1990). Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6258–6262.
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6258>
- Gallicano, G. I., McGaughey, R. W., Capco, D. G. (1997). Activation of protein kinase C after fertilization is required for remodeling the mouse egg into the zygote. *Molecular Reproduction and Development*, 46(4), 587–601.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199704\)46:4<587::AID-MRD16>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199704)46:4<587::AID-MRD16>3.0.CO;2-T)
- Ganesan, S., Anaimalai Thirumurthi, N., Raghunath, A., Vijayakumar, S., Perumal, E. (2016). Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 36(4), 554–567. <https://doi.org/10.1002/jat.3224>
- Gao, X.-Y., Li, K., Jiang, L.-L., He, M.-F., Pu, C.-H., Kang, D., Xie, J. (2017). Developmental toxicity of auranofin in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 37(5), 602–610. <https://doi.org/10.1002/jat.3410>
- Garbarino, G., Costa, S., Pestarino, M., Candiani, S. (2014). Differential expression of synapsin genes during early zebrafish development. *Neuroscience*, 280, 351–367.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.015>
- Gäreskog, M., Wentzel, P. (2004). Altered Protein Kinase C Activation Associated with Rat Embryonic Dysmorphogenesis. *Pediatric Research*, 56(6), 849–857.
<https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000145295.88601.B9>
- Garner, L. V. T., Di Giulio, R. T. (2012). Glutathione transferase pi class 2 (GSTp2) protects against the cardiac deformities caused by exposure to PAHs but not PCB-126 in zebrafish embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 155(4), 573–579.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.01.007>
- Garofalo, R. S., Orena, S. J., Rafidi, K., Torchia, A. J., Stock, J. L., Hildebrandt, A. L., ... Coleman, K. G. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *Journal of Clinical Investigation*, 112(2), 197–208. <https://doi.org/10.1172/JCI16885>

- Gate, L., Majumdar, R. S., Lunk, A., Tew, K. D. (2004). Increased Myeloproliferation in Glutathione *S*-Transferase π -deficient Mice Is Associated with a Deregulation of JNK and Janus Kinase/STAT Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 8608–8616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308613200>
- Gauron, C., Meda, F., Dupont, E., Albadri, S., Quenech'Du, N., Ipendey, E., ... Vriza, S. (2016). Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Developmental Biology*, 414(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.004>
- Glisic, B., Hrubik, J., Fa, S., Dopudj, N., Kovacevic, R., Andric, N. (2016). Transcriptional profiles of glutathione- *S*-Transferase isoforms, Cyp, and AOE genes in atrazine-exposed zebrafish embryos. *Environmental Toxicology*, 31(2), 233–244. <https://doi.org/10.1002/tox.22038>
- Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., ... Smital, T. (2015). Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 158, 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.013>
- Godard, C. A. J., Goldstone, J. V., Said, M. R., Dickerson, R. L., Woodin, B. R., Stegeman, J. J. (2005). The new vertebrate CYP1C family: Cloning of new subfamily members and phylogenetic analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(4), 1016–1024. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.231>
- Goldstein, J. A., Faletto, M. B. (1993). Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 100, 169–176. <https://doi.org/10.1289/ehp.93100169>
- Goldstone, J. V., Jönsson, M. E., Behrendt, L., Woodin, B. R., Jenny, M. J., Nelson, D. R., Stegeman, J. J. (2009). Cytochrome P450 1D1: A novel CYP1A-related gene that is not transcriptionally activated by PCB126 or TCDD. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 482(1–2), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.002>

- Goldstone, J. V, McArthur, A. G., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jönsson, M. E., ... Stegeman, J. J. (2010). Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genomics*, *11*(1), 643. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-643>
- Goody, M. F., Peterman, E., Sullivan, C., Kim, C. H. (2013). Quantification of the respiratory burst response as an indicator of innate immune health in zebrafish. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (79). <https://doi.org/10.3791/50667>
- Gottlieb, R. A. (2001). Mitochondria and Apoptosis. *Neurosignals*, *10*(3–4), 147–161. <https://doi.org/10.1159/000046884>
- Grunwald, D. J., Eisen, J. S. (2002). Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, *3*(9), 717–724. <https://doi.org/10.1038/nrg892>
- Hahn, M. E., McArthur, A. G., Karchner, S. I., Franks, D. G., Jenny, M. J., Timme-Laragy, A. R., ... Linney, E. (2014). The Transcriptional Response to Oxidative Stress during Vertebrate Development: Effects of tert-Butylhydroquinone and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *PloS One*, *9*(11), e113158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113158>
- Hahn, M. E., Timme-Laragy, A. R., Karchner, S. I., Stegeman, J. J. (2015). Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: Insights from studies in zebrafish (*Danio rerio*). *Free Radical Biology Medicine*, *88*(Pt B), 275–289. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.022>
- Haldi, M., Ton, C., Seng, W. L., McGrath, P. (2006). Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*, *9*(3), 139–151. <https://doi.org/10.1007/s10456-006-9040-2>
- Hans, S., Dong Liu, Westerfield, M. (2004). Pax8 and Pax2a function synergistically in otic specification, downstream of the Foxi1 and Dlx3b transcription factors. *Development*, *131*, 5091–5102. <https://doi.org/10.1242/dev.01346>
- Hawkins, T., Cavodeassi, F., Erdélyi, F., Szabó, G., Lele, Z. (2008). The small molecule Mek1/2 inhibitor U0126 disrupts the chordamesoderm to notochord transition in zebrafish. *BMC Developmental Biology*, *8*, 42. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-42>

- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. (2005). GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 51–88.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Helfenberger, K. E., Villalba, N. M., Buchholz, B., Boveris, A., Poderoso, J. J., Gelpi, R. J., Poderoso, C. (2018). Subcellular distribution of ERK phosphorylation in tyrosine and threonine depends on redox status in murine lung cells. *PLOS ONE*, 13(2), e0193022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193022>
- Henson, K. L., Sheehy, K. M., Gallagher, E. P. (2000). Conservation of a glutathione S-transferase in marine and freshwater fish. *Marine Environmental Research*, 50(1–5), 17–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11460686>
- Hermann, A. C., Millard, P. J., Blake, S. L., Kim, C. H. (2004). Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos. *Journal of Immunological Methods*, 292(1–2), 119–129.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.06.016>
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6–19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>
- Hines, R. N. (2007). Ontogeny of human hepatic cytochromes P450. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 21(4), 169–175.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936930>
- Holowiecki, A., O'Shields, B., Jenny, M. J. (2016). Characterization of heme oxygenase and biliverdin reductase gene expression in zebrafish (*Danio rerio*): Basal expression and response to pro-oxidant exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 311, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.09.022>
- Hong, C. C., Peterson, Q. P., Hong, J.-Y., Peterson, R. T. (2006). Artery/Vein Specification Is Governed by Opposing Phosphatidylinositol-3 Kinase and MAP Kinase/ERK Signaling. *Current Biology*, 16(13), 1366–1372.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.046>

- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hu, M.-C., Hsu, H.-J., Guo, I.-C., Chung, B. (2004). Function of Cyp11a1 in animal models. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *215*(1–2), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.024>
- Huang, H. C., Nguyen, T., Pickett, C. B. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(23), 12475–12480. <https://doi.org/10.1073/pnas.220418997>
- Ikegami, R., Hunter, P., Yager, T. D. (1999). Developmental Activation of the Capability to Undergo Checkpoint-Induced Apoptosis in the Early Zebrafish Embryo. *Developmental Biology*, *209*(2), 409–433. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1999.9243>
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Development*, *13*(1), 76–86. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>
- Jiao, W., Han, Q., Xu, Y., Jiang, H., Xing, H., Teng, X. (2019). Impaired immune function and structural integrity in the gills of common carp (*Cyprinus carpio* L.) caused by chlorpyrifos exposure: Through oxidative stress and apoptosis. *Fish Shellfish Immunology*, *86*, 239–245. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.08.060>
- Jones, H. (2010). Xenobiotic metabolism and zebrafish (*Danio rerio*) larvae. University of Birmingham Research Archive. Doctoral dissertation.
- Jönsson, M. E., Jenny, M. J., Woodin, B. R., Hahn, M. E., Stegeman, J. J. (2007). Role of AHR2 in the Expression of Novel Cytochrome P450 1 Family Genes, Cell Cycle Genes, and Morphological Defects in Developing Zebra Fish Exposed to 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl or 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicological Sciences*, *100*(1), 180–193. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm207>

- Jörgens, K., Hillebrands, J.-L., Hammes, H.-P., Kroll, J. (2012). Zebrafish: A Model for Understanding Diabetic Complications. *Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes*, 120(04), 186–187. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1304565>
- Juriscova, A., Varmuza, S., Casper, R. F. (1996). Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Molecular Human Reproduction*, 2(2), 93–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9238664>
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- Kamachi, Y., Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, 140(20), 4129–4144. <https://doi.org/10.1242/dev.091793>
- Kaneko, Y., Sakakibara, S., Imai, T., Suzuki, A., Nakamura, Y., Sawamoto, K., ... Okano, H. (2000). Musashi1: An Evolutionally Conserved Marker for CNS Progenitor Cells Including Neural Stem Cells. *Developmental Neuroscience*, 22(1–2), 139–153. <https://doi.org/10.1159/000017435>
- Kang, K. W., Cho, I. J., Lee, C. H., Kim, S. G. (2003). Essential Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent CCAAT/Enhancer Binding Protein Activation in the Induction of Glutathione S-Transferase by Oltipraz. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 95(1), 53–66. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.1.53>
- Kang, K. W., Lee, S. J., Park, J. W., Kim, S. G. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Molecular Pharmacology*, 62(5), 1001–1010. <https://doi.org/10.1124/MOL.62.5.1001>
- Kang, K. W., Cho, M. K., Lee, C. H., Kim, S. G. (2001). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt by tert-butylhydroquinone is responsible for antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction in H4IIE cells. *Molecular Pharmacology*, 59(5), 1147–1156. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306698>

- Kao, H. T., Porton, B., Czernik, A. J., Feng, J., Yiu, G., Häring, M., ... Greengard, P. (1998). A third member of the synapsin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4667–4672.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4667>
- Kari, G., Rodeck, U., Dicker, A. P. (2007). Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 82(1), 70–80. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100223>
- Kaslin, J., Ganz, J., Geffarth, M., Grandel, H., Hans, S., Brand, M. (2009). Stem Cells in the Adult Zebrafish Cerebellum: Initiation and Maintenance of a Novel Stem Cell Niche. *Journal of Neuroscience*, 29(19), 6142–6153.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0072-09.2009>
- Kawahara, A., Dawid, I. B. (2002). Developmental expression of zebrafish *emx1* during early embryogenesis. *Gene Expression Patterns: GEP*, 2(3–4), 201–206.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12617801>
- Kelleher, A., Zhan, B., Asojo, O. A. (2013). Structure of monomeric Na-GST-3, a glutathione S-transferase from the major human hookworm parasite *Necator americanus*. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(Pt 8), 839–843.
<https://doi.org/10.1107/S1744309113017661>
- Kelly, M. L., Astsaturov, A., Rhodes, J., Chernoff, J. (2014). A Pak1/Erk Signaling Module Acts through Gata6 to Regulate Cardiovascular Development in Zebrafish. *Developmental Cell*, 29(3), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.003>
- Kim, J.-H., Dahms, H.-U., Rhee, J.-S., Lee, Y.-M., Lee, J., Han, K.-N., Lee, J.-S. (2010). Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology Pharmacology: CBP*, 151(1), 99–106.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.09.001>
- Kim, J.-W., Li, M.-H., Jang, J.-H., Na, H.-K., Song, N.-Y., Lee, C., ... Surh, Y.-J. (2008). 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ rescues PC12 cells from H₂O₂-induced apoptosis through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1: Potential roles of Akt and ERK1/2. *Biochemical Pharmacology*, 76(11), 1577–1589. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2008.08.007>

- Kim, S.-H., Schmitt, C. E., Woolls, M. J., Holland, M. B., Kim, J.-D., Jin, S.-W. (2013). Vascular endothelial growth factor signaling regulates the segregation of artery and vein via ERK activity during vascular development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(4), 1212–1216.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.076>
- Kim, S. G., Kim, S. O. (2004). Pkc downstream of pi3-kinase regulates peroxynitrite formation for nrf2-mediated gsta2 induction. *Archives of Pharmacal Research*, 27(7), 757–762. <https://doi.org/10.1007/BF02980145>
- Kimmel, C B, Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253–310.
<https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., ... Yamamoto, M. (2009). The Antioxidant Defense System Keap1-Nrf2 Comprises a Multiple Sensing Mechanism for Responding to a Wide Range of Chemical Compounds. *Molecular and Cellular Biology*, 29(2), 493–502.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01080-08>
- Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., ... Yamamoto, M. (2002). Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes to Cells*, 7(8), 807–820.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00561.x>
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., ... Yamamoto, M. (2009). The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Molecular and Cellular Biology*, 29(2), 493–502.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01080-08>
- Kobayashi, M., Yamamoto, M. (2006). Nrf2–Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advances in Enzyme Regulation*, 46(1), 113–140.
<https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2006.01.007>

- Korkmaz, V., Güngördü, A., Ozmen, M. (2018). Comparative evaluation of toxicological effects and recovery patterns in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to phosalone-based and cypermethrin-based pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 265–272
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.05.055>
- Kratz, E., Eimon, P. M., Mukhyala, K., Stern, H., Zha, J., Strasser, A., ... Ashkenazi, A. (2006). Functional characterization of the Bcl-2 gene family in the zebrafish. *Cell Death Differentiation*, 13(10), 1631–1640. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402016>
- Krens, S. F. G., Corredor-Adámez, M., He, S., Snaar-Jagalska, B. E., Spaink, H. P. (2008). ERK1 and ERK2 MAPK are key regulators of distinct gene sets in zebrafish embryogenesis. *BMC Genomics*, 9, 196. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-196>
- Krens, S. F. G., He, S., Spaink, H. P., Snaar-Jagalska, B. E. (2006). Characterization and expression patterns of the MAPK family in zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 6(8), 1019–1026. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.04.008>
- Kubota, A., Goldstone, J. V., Lemaire, B., Takata, M., Woodin, B. R., Stegeman, J. J. (2015). Role of Pregnane X Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor in Transcriptional Regulation of pax, CYP2, and CYP3 Genes in Developing Zebrafish. *Toxicological Sciences*, 143(2), 398–407. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu240>
- Lagast, H., Pozzan, T., Waldvogel, F. A., Lew, P. D. (1984). Phorbol myristate acetate stimulates ATP-dependent calcium transport by the plasma membrane of neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 73(3), 878–883. <https://doi.org/10.1172/JCI111284>
- Lam, C. S., März, M., Strähle, U. (2009). gfap and nestin reporter lines reveal characteristics of neural progenitors in the adult zebrafish brain. *Developmental Dynamics*, 238(2), 475–486. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21853>
- Laue, K., Rajshekar, S., Courtney, A. J., Lewis, Z. A., Goll, M. G. (2019). The maternal to zygotic transition regulates genome-wide heterochromatin establishment in the zebrafish embryo. *Nature Communications*, 10(1), 1551. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09582-3>

- Li, H., Cao, F., Zhao, F., Yang, Y., Teng, M., Wang, C., Qiu, L. (2018). Developmental toxicity, oxidative stress and immunotoxicity induced by three strobilurins (pyraclostrobin, trifloxystrobin and picoxystrobin) in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 207, 781–790. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.146>
- Li, P. F., Maasch, C., Haller, H., Dietz, R., von Harsdorf, R. (1999). Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 100(9), 967–973.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468528>
- Li, W.-H., Zhou, L., Li, Z., Wang, Y., Shi, J.-T., Yang, Y.-J., Gui, J.-F. (2015). Zebrafish Lbh-like Is Required for Otx2-mediated Photoreceptor Differentiation. *International Journal of Biological Sciences*, 11(6), 688–700. <https://doi.org/10.7150/ijbs.11244>
- Li, Z.-X., Chen, J.-W., Yuan, F., Huang, Y.-Y., Zhao, L.-Y., Li, J., ... Guan, Y.-Y. (2013). Xyloketal B Exhibits Its Antioxidant Activity through Induction of HO-1 in Vascular Endothelial Cells and Zebrafish. *Marine Drugs*, 11(12), 504–522. <https://doi.org/10.3390/md11020504>
- Lin, C.-Y., Chen, J.-H., Fu, R.-H., Tsai, C.-W. (2014). Induction of Pi Form of Glutathione S-Transferase by Carnosic Acid Is Mediated through PI3K/Akt/NF-κB Pathway and Protects against Neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 27(11), 1958–1966. <https://doi.org/10.1021/tx5003063>
- Link B.A., Cui, S. (2005). Characterization of Zebrafish Atypical PKC Zeta: Genetic Interactions With aPKC Lamda During Retinal Development. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 46(13), 590–590. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2400059>
- Liu, T., Shi, Y., Chan, M. T. V., Peng, G., Zhang, Q., Sun, X., ... Cheng, C. H. K. (2018). Developmental protein kinase C hyper-activation results in microcephaly and behavioral abnormalities in zebrafish. *Translational Psychiatry*, 8(1), 232. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0285-5>
- Liu, H., Nie, F.-H., Lin, H.-Y., Ma, Y., Ju, X.-H., Chen, J.-J., Gooneratne, R. (2016). Developmental toxicity, oxidative stress, and related gene expression induced by dioxin-like PCB 126 in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 31(3), 295–303. <https://doi.org/10.1002/tox.22044>

- Liu, L., Zhu, S., Gong, Z., Low, B. C. (2008). K-ras/PI3K-Akt signaling is essential for zebrafish hematopoiesis and angiogenesis. *PLoS ONE*, 3(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002850>
- Liu, W. S., Heckman, C. A. (1998). The sevenfold way of PKC regulation. *Cellular Signalling*, 10(8), 529–542. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794251>
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lo, H.-W., Ali-Osman, F. (2007). Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(4), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.06.009>
- Lun, K., Brand, M. (1998). A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish pax2.1 gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development*, 125, 3049–3062.
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.867.5127&rep=rep1&type=pdf>
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J. L., Anderson, D. J. (1998). neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron*, 20(3), 469–482.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9539122>
- Malek, R. L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M. A., Gerhard, G. S. (2004). The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 138(3), 363–373.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.08.014>
- Manandhar, S., Cho, J.-M., Kim, J.-A., Kensler, T. W., Kwak, M.-K. (2007). Induction of Nrf2-regulated genes by 3H-1, 2-dithiole-3-thione through the ERK signaling pathway in murine keratinocytes. *European Journal of Pharmacology*, 577(1–3), 17–27. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2007.08.018>
- Mannervik, B., Awasthi, Y. C., Board, P. G., Hayes, J. D., Di Ilio, C., Ketterer, B., ... Wolf, C. R. (1992). Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochemical Journal*, 282(1), 305–306. <https://doi.org/10.1042/bj2820305>

- Mansuri, M. L., Parihar, P., Solanki, I., Parihar, M. S. (2014). Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes Nutrition*, 9(3), 400. <https://doi.org/10.1007/s12263-014-0400-z>
- Martindale, M. Q. (2005). The evolution of metazoan axial properties. *Nature Reviews Genetics*, 6(12), 917–927. <https://doi.org/10.1038/nrg1725>
- März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesel, B., Takamiya, M., ... Strähle, U. (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia*, 58(7). <https://doi.org/10.1002/glia.20971>
- Matsumoto, M., Imagawa, M., Aoki, Y. (1999). Identification of an enhancer element of class Pi glutathione S-transferase gene required for expression by a co-planar polychlorinated biphenyl. In *Biochemical Journal* (Vol. 338). <https://pdfs.semanticscholar.org/19f8/41116545a7c3f53cc081e6013bf7228b7801.pdf>
- Mattingly, C. J., McLachlan, J. A., Toscano, W. A. (2001). Green fluorescent protein (GFP) as a marker of aryl hydrocarbon receptor (AhR) function in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Health Perspectives*, 109(8), 845–849. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109845>
- Mazza, F., Goodman, A., Lombardo, G., Vanella, A., Abraham, N. G. (2003). Heme oxygenase-1 gene expression attenuates angiotensin II-mediated DNA damage in endothelial cells. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 228(5), 576–583. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12709590>
- McCollum, C. W., Ducharme, N. a, Bondesson, M., Gustafsson, J.-A. (2011). Developmental toxicity screening in zebrafish. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today : Reviews*, 93(2), 67–114. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20210>
- McCurley, A. T., Callard, G. V. (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology*, 9, 102. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-102>
- McElwee, J. J., Schuster, E., Blanc, E., Piper, M. D., Thomas, J. H., Patel, D. S., ... Gems, D. (2007). Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biology*, 8(7), R132. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r132>

- Meng, X. W., Heldebrant, M. P., Scott H. Kaufmann, S. H. (2001). Phorbol 12-myristate 13-Acetate Inhibits Death Receptor-mediated Apoptosis in Jurkat Cells by Disrupting Recruitment of Fas-associated Polypeptide with Death Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 3776-3783. doi: 10.1074/jbc.M107218200
- Meyer, A., Van de Peer, Y. (2005). From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays*, 27(9), 937–945.
<https://doi.org/10.1002/bies.20293>
- Mhaidat, N. M., Bouklihacene, M., Thorne, R. F. (2014). 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C- δ . *Oncology Letters*, 8(2), 699–704.
<https://doi.org/10.3892/ol.2014.2211>
- Mills, M. G., Gallagher, E. P. (2017). A targeted gene expression platform allows for rapid analysis of chemical-induced antioxidant mRNA expression in zebrafish larvae. *PloS One*, 12(2), e0171025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171025>
- Miyamoto, Y., Suyama, K., Baba, H., Miyamoto, Y., Suyama, K., Baba, H. (2017). Recent Advances in Targeting the EGFR Signaling Pathway for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 752. <https://doi.org/10.3390/ijms18040752>
- Morita, T., Nitta, H., Kiyama, Y., Mori, H., Mishina, M. (1995). Differential expression of two zebrafish *emx* homeoprotein mRNAs in the developing brain. *Neuroscience Letters*, 198(2), 131–134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8592638>
- Motohashi, H., Yamamoto, M. (2004). Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, 10(11), 549–557.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.09.003>
- Mulcahy, R. T., Wartman, M. A., Bailey, H. H., Gipp, J. J. (1997). Constitutive and β -Naphthoflavone-induced Expression of the Human γ -Glutamylcysteine Synthetase Heavy Subunit Gene Is Regulated by a Distal Antioxidant Response Element/TRE Sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 7445–7454.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.7445>
- Musashi, M., Ota, S., Shiroshita, N. (2000). The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *International Journal of Hematology*, 72(1), 12–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979203>

- Na, H.-K., Kim, E.-H., Jung, J.-H., Lee, H.-H., Hyun, J.-W., Surh, Y.-J. (2008). (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 171–177.
<https://doi.org/10.1016/J.ABB.2008.04.003>
- Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, 19 Suppl 1, 38–48.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12096329>
- Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Tsujita, T., Akiyama, S.-I., Wakasa, T., Mukaigasa, K., ... Kobayashi, M. (2011). Tissue-restricted expression of Nrf2 and its target genes in zebrafish with gene-specific variations in the induction profiles. *PLoS One*, 6(10), e26884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026884>
- Nebert, D. W., Dalton, T. P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 6(12), 947–960. <https://doi.org/10.1038/nrc2015>
- Niedel, J. E., Kuhn, L. J., Vandenberg, G. R. (1983). Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(1), 36–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.1.36>
- Nornes HO, Dressler GR, Knapik EW, Deutsch U, G. P. (1990). Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. - PubMed - NCBI. *Development*, 109(4), 797–809.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1977575>
- Nüsslein-Volhard, C., Dahm, R. (2002). *Zebrafish: a practical approach*. Oxford University Press.
- OECD. (2013). OECD (236) GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS; FISH EMBRYO ACUTE TOXICITY (FET) TEST. *OECD*, 236(July), 1–22.
www.oecd.org
- Ohno, S., Nishizuka, Y. (2002). Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *Journal of Biochemistry*, 132(4), 509–511.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003249>

- Okuda, Y., Ogura, E., Kondoh, H., Kamachi, Y. (2010). B1 SOX Coordinate Cell Specification with Patterning and Morphogenesis in the Early Zebrafish Embryo. *PLoS Genetics*, 6(5), e1000936. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000936>
- Otto, D. M. E., Henderson, C. J., Carrie, D., Davey, M., Gundersen, T. E., Blomhoff, R., ... Wolf, C. R. (2003). Identification of Novel Roles of the Cytochrome P450 System in Early Embryogenesis: Effects on Vasculogenesis and Retinoic Acid Homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 23(17), 6103–6116. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.17.6103-6116.2003>
- Oubaha, M., Lin, M. I., Margaron, Y., Filion, D., Price, E. N., Zon, L. I., ... Gratton, J.-P. (2012). Formation of a PKC / -catenin complex in endothelial cells promotes angiopoietin-1-induced collective directional migration and angiogenic sprouting. *Blood*, 120(16), 3371–3381. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-419721>
- Pae, H.-O., Oh, G.-S., Jeong, S.-O., Jeong, G.-S., Lee, B.-S., Choi, B.-M., ... Chung, H.-T. (2006). 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose up-regulates heme oxygenase-1 expression by stimulating Nrf2 nuclear translocation in an extracellular signal-regulated kinase-dependent manner in HepG2 cells. *World Journal of Gastroenterology*, 12(2), 214. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i2.214>
- Papaiahgari, S., Kleeberger, S. R., Cho, H.-Y., Kalvakolanu, D. V., Reddy, S. P. (2004). NADPH Oxidase and ERK Signaling Regulates Hyperoxia-induced Nrf2-ARE Transcriptional Response in Pulmonary Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42302–42312. <https://doi.org/10.1074/JBC.M408275200>
- Park, I.C., Park, M.J., Rhee, C.H., Lee, J.I., Choe, T.B., Jang, J.J., Lee, S.H., Hong, S.I. (2001). Protein kinase C activation by PMA rapidly induces apoptosis through caspase-3/ CPP32 and serine protease(s) in a gastric cancer cell line. *International Journal of Oncology*, 18(5), 1077-83. doi: 10.3892/ijo.18.5.1077
- Parng, C., Seng, W. L., Semino, C., McGrath, P. (2002). Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1(1), 41–48. <https://doi.org/10.1089/154065802761001293>
- Patarnello, T., Bargelloni, L., Boncinelli, E., Spada, F., Pannese, M., Broccoli, V. (1997). Evolution of *Emx* genes and brain development in vertebrates. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1389), 1763–1766. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0244>

- Patten, S. A., Roy, B., Cunningham, M. E., Stafford, J. L., Ali, D. W. (2010). Protein kinase C γ is a signaling molecule required for the developmental speeding of α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate receptor kinetics. *European Journal of Neuroscience*, 31(9), no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07216.x>
- Patten, S. A., Sihra, R. K., Dhami, K. S., Coutts, C. A., Ali, D. W. (2007). Differential expression of PKC isoforms in developing zebrafish. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 25(3), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.02.003>
- Patwardhan, R. S., Sharma, D., Checker, R., Sandur, S. K. (2014). Mitigation of radiation-induced hematopoietic injury via regulation of cellular MAPK/phosphatase levels and increasing hematopoietic stem cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 68, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.004>
- Patwardhan, R. S., Checker, R., Sharma, D., Sandur, S. K., Sainis, K. B. (2013). Involvement of ERK-Nrf-2 Signaling in Ionizing Radiation Induced Cell Death in Normal and Tumor Cells. *PLoS ONE*, 8(6), e65929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065929>
- Payne, E., Look, T. (2009). Zebrafish modelling of leukaemias. *British Journal of Haematology*, 146(3), 247–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07705.x>
- Perez, J. L., Khatri, L., Chang, C., Srivastava, S., Osten, P., Ziff, E. B. (2001). PICK1 targets activated protein kinase Calpha to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(15), 5417–5428. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466413>
- Perkins, E. J., Ankley, G. T., Crofton, K. M., Garcia-reyero, N., Lalone, C. A., Johnson, M. S., ... Villeneuve, D. L. (2013). *Current Perspectives on the Use of Alternative Species in Human Health and Ecological Hazard Assessments*. (9), 1002–1010.

- Pfeffer, P. L., Gerster, T., Lun, K., Brand, M., Busslinger, M. (1998). Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. *Development (Cambridge, England)*, 125(16), 3063–3074. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671580>
- Pfeifhofer, C., Gruber, T., Letschka, T., Thuille, N., Lutz-Nicoladoni, C., Hermann-Kleiter, N., ... Baier, G. (2006). Defective IgG2a/2b class switching in PKC alpha^{-/-} mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(10), 6004–6011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.10.6004>
- Pierce, A., Heyworth, C. M., Nicholls, S. E., Spooncer, E., Dexter, T. M., Lord, J. M., ... Whetton, A. D. (1998). An Activated Protein Kinase C α Gives a Differentiation Signal for Hematopoietic Progenitor Cells and Mimicks Macrophage Colony-stimulating Factor–stimulated Signaling Events. *The Journal of Cell Biology*, 140(6), 1511. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2132662/>
- Plachov, D., Chowdhury, K., Walther, C., Simon, D., Guenet, J. L., Gruss, P. (1990). Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development (Cambridge, England)*, 110(2), 643–651. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1723950>
- Poli, A., Mongiorgi, S., Cocco, L., Follo, M. Y. (2014). Protein kinase C involvement in cell cycle modulation. *Biochemical Society Transactions*, 42(5), 1471–1476. <https://doi.org/10.1042/BST20140128>
- Popovic, M., Zaja, R., Smital, T. (2010). Organic anion transporting polypeptides (OATP) in zebrafish (*Danio rerio*): Phylogenetic analysis and tissue distribution. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular Integrative Physiology*, 155(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.011>
- Postlethwait, J., Amores, A., Cresko, W., Singer, A., Yan, Y.-L. (2004). Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends in Genetics*, 20(10), 481–490. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.08.001>
- Pyati, U. J., Look, A. T., Hammerschmidt, M. (2007). Zebrafish as a powerful vertebrate model system for in vivo studies of cell death. *Seminars in Cancer Biology*, 17(2), 154–165. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2006.11.007>

- Qin, Z., Kidd, A. R., Thomas, J. L., Poss, K. D., Hyde, D. R., Raymond, P. A., Thummel, R. (2011). FGF signaling regulates rod photoreceptor cell maintenance and regeneration in zebrafish. *Experimental Eye Research*, 93(5), 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.09.003>
- Raman, R., Damle, I., Rote, R., Banerjee, S., Dingare, C., Sonawane, M. (2016). aPKC regulates apical localization of Lgl to restrict elongation of microridges in developing zebrafish epidermis. *Nature Communications*, 7(1), 11643. <https://doi.org/10.1038/ncomms11643>
- Reichard, J. F., Motz, G. T., Puga, A. (2007). Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7074–7086. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm638>
- Rentzsch, F., Bakkers, J., Kramer, C., Hammerschmidt, M. (2004). Fgf signaling induces posterior neuroectoderm independently of Bmp signaling inhibition. *Developmental Dynamics*, 231(4), 750–757. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20244>
- Ronnstrand, L. (2004). Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(19–20), 2535–2548. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4189-6>
- Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J. M., Boeckeler, K., Parker, P. J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 103–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2847>
- Ruben, L. N., Johnson, R. O., Bergin, A., Clothier, R. H. (2000). Apoptosis and the cell cycle in *Xenopus*: PMA and MPMA exposure of splenocytes. *Apoptosis*, 5(3), 225–33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11225844>
- Rubinstein, A. L. (2003). Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery Development*, 6(2), 218–223. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669457>
- Rubinstein, A. L. (2006). Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opinion on Drug Metabolism Toxicology*, 2(2), 231–240. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.2.231>

- Rushmore, T. H., Morton, M. R., Pickett, C. B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(18), 11632–11639. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1646813>
- Russo, A., Saide, A., Smaldone, S., Faraonio, R., Russo, G. (2017). Role of uL3 in Multidrug Resistance in p53-Mutated Lung Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 547. <https://doi.org/10.3390/ijms18030547>
- Rybin, V. O., Xu, X., Steinberg, S. F. (1999). Activated protein kinase C isoforms target to cardiomyocyte caveolae: stimulation of local protein phosphorylation. *Circulation Research*, 84(9), 980–988
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10325235>
- Saad, M., Cavanaugh, K., Verbueken, E., Pype, C., Casteleyn, C., Van Ginneken, C., Van Cruchten, S. (2016). Xenobiotic metabolism in the zebrafish: a review of the spatiotemporal distribution, modulation and activity of Cytochrome P450 families 1 to 3. *The Journal of Toxicological Sciences*, 41(1), 1–11.
<https://doi.org/10.2131/jts.41.1>
- Saba-El-Leil, M. K., Frémin, C., Meloche, S. (2016). Redundancy in the World of MAP Kinases: All for One. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 67.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00067>
- Saito, N., Shirai, Y. (2002). Protein Kinase C (PKC): Function of Neuron Specific Isootype. *Journal of Biochemistry*, 132(5), 683–687.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003274>
- Sant, K. E., Hansen, J. M., Williams, L. M., Tran, N. L., Goldstone, J. V., Stegeman, J. J., ... Timme-Laragy, A. (2017). The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo. *Redox Biology*, 13, 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.023>
- Sau, A., Filomeni, G., Pezzola, S., D’Aguanno, S., Tregno, F. P., Urbani, A., ... Caccuri, A. M. (2012). Targeting GSTP1-1 induces JNK activation and leads to apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human osteosarcoma cell lines. *Molecular BioSystems*, 8(4), 994–1006. <https://doi.org/10.1039/c1mb05295k>

- Schechter, R. L., Alaoui-Jamali, M. A., Batist, G. (1992). Glutathione S-transferase in chemotherapy resistance and in carcinogenesis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 70(5), 349–353.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1353967>
- Schenck, A., Goto-Silva, L., Collinet, C., Rhinn, M., Giner, A., Habermann, B., ... Zerial, M. (2008). The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell*, 133(3), 486–497.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.044>
- Schiavone, M., Rampazzo, E., Casari, A., Battilana, G., Persano, L., Moro, E., ... Argenton, F. (2014). Zebrafish reporter lines reveal in vivo signaling pathway activities involved in pancreatic cancer. *Disease Models Mechanisms*, 7(7), 883–894. <https://doi.org/10.1242/dmm.014969>
- Schlosser, G., Northcutt, R. G. (2000). Development of neurogenic placodes in *Xenopus laevis*. *The Journal of Comparative Neurology*, 418(2), 121–146.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10701439>
- Schmidt, R., Strähle, U., Scholpp, S. (2013). Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. *Neural Development*, 8:3, <http://www.neuraldevelopment.com/content/8/1/3>
- Schnekenburger, M., Karius, T., Diederich, M. (2014). Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 170.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00170>
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D. (2008). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research International*, 15(5), 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>
- Seger, R., Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(9), 726–735. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7601337>
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(Pt 1), 1–16. doi: 10.1042/0264-6021:3600001

- Sheikh, M. S., Fornace, A. J. (2000). Role of p53 family members in apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 182(2), 171–181. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200002\)182:2<171::AID-JCP5>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200002)182:2<171::AID-JCP5>3.0.CO;2-3)
- Shen, G., Hebbar, V., Nair, S., Xu, C., Li, W., Lin, W., ... Kong, A.-N. T. (2004). Regulation of Nrf2 Transactivation Domain Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 23052–23060. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401368200>
- Shi, X., Zhou, B. (2010). The role of Nrf2 and MAPK pathways in PFOS-induced oxidative stress in zebrafish embryos. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 115(2), 391–400
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq066>
- Shinya, M., Koshida, S., Sawada, A., Kuroiwa, A., Takeda, H. (2001). Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Development (Cambridge, England)*, 128(21), 4153–4164.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684653>
- Slatter, C. A., Kanji, H., Coutts, C. A., Ali, D. W. (2005). Expression of PKC in the developing zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Neurobiology*, 62(4), 425-438. doi: 10.1002/neu.20110
- Sommer, L., Ma, Q., Anderson, D. J. (1996). neurogenins, a Novel Family of tonal-Related bHLH Transcription Factors, Are Putative Mammalian Neuronal Determination Genes That Reveal Progenitor Cell Heterogeneity in the Developing CNS and PNS. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 8(4), 221–241.
<https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0060>
- Son, Y., Cheong, Y.-K., Kim, N.-H., Chung, H.-T., Kang, D. G., Pae, H.-O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *Journal of Signal Transduction*, 2011, 792639.
<https://doi.org/10.1155/2011/792639>
- Stack, J. H., Newport, J. W. (1997). Developmentally regulated activation of apoptosis early in *Xenopus* gastrulation results in cyclin A degradation during interphase of the cell cycle. *Development (Cambridge, England)*, 124(16), 3185–3195.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9272959>

- Stegeman, J. J., Miller, M. R., Hinton, D. E. (1989). Cytochrome P450IA1 induction and localization in endothelium of vertebrate (teleost) heart. *Molecular Pharmacology*, 36(5), 723–729. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2685543>
- Stoilov, I., Jansson, I., Sarfarazi, M., Schenkman, J. B. (2001). Roles of cytochrome p450 in development. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 18(1), 33–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522124>
- Stoletov, K., Klemke, R. (2008). Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. *Oncogene*, 27(33), 4509–4520. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.95>
- Sun, Z., Huang, Z., Zhang, D. D. (2009). Phosphorylation of Nrf2 at Multiple Sites by MAP Kinases Has a Limited Contribution in Modulating the Nrf2-Dependent Antioxidant Response. *PLoS ONE*, 4(8), e6588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006588>
- Suzuki, T., Takagi, Y., Osanai, H., Li, L., Takeuchi, M., Katoh, Y., Kobayashi, M. (2005). Pi class glutathione S-transferase genes are regulated by Nrf2 through an evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish. *Biochemical Journal*, 388(Pt 1), 65–73. <http://www.biochemj.org/content/388/1/65.article-info>
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempthues, K. J., Miwa, J., Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development (Cambridge, England)*, 125(18), 3607–3614. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716526>
- Tadros, W., Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 136(18), 3033–3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>
- Taguchi, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16(2), 123–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>
- Taranova, O.V., Magness, S.T., Fagan, B.M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S.R., Pevny, L. H. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Development*, 20(9), 1187–1202. <https://doi.org/10.1101/gad.1407906>

- Taylor, S.J. Johnson, R. O., Ruben, L.N., Clothier, R.H. (2003). Splenic lymphocytes of adult *Xenopus* respond differentially to PMA in vitro by either dying or dividing: significance for cancer resistance in this species. *Apoptosis*, 8(1), 81-90. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12510155>
- Teicher, B. A. (2006). Protein Kinase C as a Therapeutic Target. *Clinical Cancer Research*, 12(18), 5336–5345. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0945>
- Timme-Laragy, A. R., Goldstone, J. V., Imhoff, B. R., Stegeman, J. J., Hahn, M. E., Hansen, J. M. (2013). Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.011>
- Timme-Laragy, A. R., Karchner, S. I., Franks, D. G., Jenny, M. J., Harbeitner, R. C., Goldstone, J. V, ... Hahn, M. E. (2012). Nrf2b, novel zebrafish paralog of oxidant-responsive transcription factor NF-E2-related factor 2 (NRF2). *The Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4609–4627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260125>
- Timme-Laragy, A. R., Van Tiem, L. a, Linney, E. a, Di Giulio, R. T. (2009). Antioxidant responses and NRF2 in synergistic developmental toxicity of PAHs in zebrafish. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 109(2), 217–227. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp038>
- Toelle, S. P., Poretti, A., Weber, P., Seute, T., Bromberg, J. E. C., Scheer, I., Boltshauser, E. (2015). Cerebellar Hypoplasia and Dysmorphia in Neurofibromatosis Type 1. *The Cerebellum*, 14(6), 642–649. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0658-8>
- Traore, K., Sharma, R., Thimmulappa, R. K., Watson, W. H., Biswal, S., Trush, M. A. (2008). Redox-regulation of Erk1/2-directed phosphatase by reactive oxygen species: role in signaling TPA-induced growth arrest in ML-1 cells. *Journal of Cellular Physiology*, 216(1), 276–285. <https://doi.org/10.1002/jcp.21403>
- Tsai, C.-W., Lin, A.-H., Wang, T.-S., Liu, K.-L., Chen, H.-W., Lii, C.-K. (2010). Methionine restriction up-regulates the expression of the pi class of glutathione S-transferase partially via the extracellular signal-regulated kinase-activator protein-1 signaling pathway initiated by glutathione depletion. *Molecular Nutrition Food Research*, 54(6), 841–850. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900083>

- Tseng, H.-P., Hseu, T.-H., Buhler, D. R., Wang, W.-D., Hu, C.-H. (2005). Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 205(3), 247–258.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.019>
- Usenko, C. Y., Harper, S. L., Tanguay, R. L. (2008). Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 229(1), 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.12.030>
- Vallee, M., Aiba, K., Piao, Y., Palin, M.-F., Ko, M. S. H., Sirard, M.-A. (2008). Comparative analysis of oocyte transcript profiles reveals a high degree of conservation among species. *Reproduction*, 135(4), 439–448.
<https://doi.org/10.1530/REP-07-0342>
- Van Tiem, L. A., Di Giulio, R. T. (2011). AHR2 knockdown prevents PAH-mediated cardiac toxicity and XRE- and ARE-associated gene induction in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(3), 280–287.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.002>
- Vascotto, S. G., Beckham, Y., Kelly, G. M. (1997). The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 75(5), 479–485.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551173>
- Vaz, R., Hofmeister, W., Lindstrand, A. (2019). Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Limitations and Benefits of Current Tools and Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1296.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061296>
- Voelker, D., Stetefeld, N., Schirmer, K., Scholz, S. (2008). The role of cyp1a and heme oxygenase 1 gene expression for the toxicity of 3,4-dichloroaniline in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 86(1), 112–120.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.10.007>
- Wang, Y., Shen, C., Wang, C., Zhou, Y., Gao, D., Zuo, Z. (2018). Maternal and embryonic exposure to the water soluble fraction of crude oil or lead induces behavioral abnormalities in zebrafish (*Danio rerio*), and the mechanisms involved. *Chemosphere*, 191, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.096>

- Wang, Y., Zhong, T., Qian, L., Dong, Y., Jiang, Q., Tan, L., Song, H. (2005). Wortmannin induces zebrafish cardia bifida through a mechanism independent of phosphoinositide 3-kinase and myosin light chain kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(1), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.145>
- Wiegand, C., Krause, E., Steinberg, C., Pflugmacher, S. (2001). Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(3), 199–205. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2073>
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Giese, M., Frank, H., Steinberg, C. (2000). Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(2), 122–131. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1845>
- Williams, L. M., Timme-Laragy, A. R., Goldstone, J. V., McArthur, A. G., Stegeman, J. J., Smolowitz, R. M., Hahn, M. E. (2013). Developmental Expression of the Nfe2-Related Factor (Nrf) Transcription Factor Family in the Zebrafish, *Danio rerio*. *PLoS ONE*, 8(10), e79574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079574>
- Wilson, N. S., Dixit, V., Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunology*, 10(4), 348–355. <https://doi.org/10.1038/ni.1714>
- Woo, S., Yum, S., Park, H.-S., Lee, T.-K., Ryu, J.-C. (2009). Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 149(3), 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.002>
- Wortzel, I., Seger, R. (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*, 2(3), 195–209. <https://doi.org/10.1177/1947601911407328>
- Wu, Y.-C., Liu, C.-Y., Chen, Y.-H., Chen, R.-F., Huang, C.-J., Wang, I.-J. (2012). Blood Vessel Epicardial Substance (Bves) Regulates Epidermal Tight Junction Integrity through Atypical Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39887–39897. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.372078>

- Wu, B., Dong, D. (2012). Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(12), 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.007>
- Wu, M., Xu, H., Shen, Y., Qiu, W., Yang, M. (2011). Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(10), 2335–2341. <https://doi.org/10.1002/etc.634>
- Wu, S. L., Staudinger, J., Olson, E. N., Rubin, C. S. (1998). Structure, expression, and properties of an atypical protein kinase C (PKC3) from *Caenorhabditis elegans*. PKC3 is required for the normal progression of embryogenesis and viability of the organism. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 1130–1143. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.1130>
- Xiong, C., Liu, X., Meng, A. (2015). The Kinase Activity-deficient Isoform of the Protein Araf Antagonizes Ras/Mitogen-activated Protein Kinase (Ras/MAPK) Signaling in the Zebrafish Embryo. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(42), 25512–25521. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.676726>
- Xu, C., Yuan, X., Pan, Z., Shen, G., Kim, J.-H., Yu, S., ... Kong, A.-N. T. (2006). Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1918–1926. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0497>
- Yabu, T., Kishi, S., Okazaki, T., Yamashita, M. (2001a). Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cells and zebrafish embryo. *Biochemical Journal*, 360(1), 39. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600039>
- Yabu, T., Todoriki, S., Yamashita, M. (2001b). Stress-induced apoptosis by heat shock, UV and gamma-ray irradiation in zebrafish embryos detected by increased caspase activity and whole-mount TUNEL staining. *Fisheries Science*, 67(2), 333–340. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00233.x>
- Yamashita, M. (2003). Apoptosis in zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4), 731–742. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2003.08.013>

- Yamazaki, K., Teraoka, H., Dong, W., Stegeman, J. J., Hiraga, T. (2002). cDNA cloning and expressions of cytochrome P450 1A in zebrafish embryos. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(9), 829–833.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399609>
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E., Hemmings, B. A. (2003). Protein Kinase B α /Akt1 Regulates Placental Development and Fetal Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32124–32131. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302847200>
- Yao, Z., Seger, R. (2009). The ERK signaling cascade-Views from different subcellular compartments. *BioFactors*, 35(5), 407–416. <https://doi.org/10.1002/biof.52>
- Yoon, S., Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24(1), 21–44. <https://doi.org/10.1080/02699050500284218>
- Yoshida, T., Ito, A., Matsuda, N., Mishina, M. (2002). *Regulation by Protein Kinase A Switching of Axonal Pathfinding of Zebrafish Olfactory Sensory Neurons through the Olfactory Placode – Olfactory Bulb Boundary*. 22(12), 4964–4972.
- Yoshida, T, Maulik, N., Ho, Y. S., Alam, J., Das, D. K. (2001). H(mox-1) constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: A study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the Heme oxygenase-1 gene. *Circulation*, 103(12), 1695–1701. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11273999>
- Youle, R. J., Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrm2308>
- Yu, S., Yin, Y., Zhu, J., Huang, X., Luo, Q., Xu, J., ... Liu, J. (2010). A modulatory bifunctional artificial enzyme with both SOD and GPx activities based on a smart star-shaped pseudo-block copolymer. *Soft Matter*, 6(21), 5342. <https://doi.org/10.1039/c0sm00162g>

- Yu, I. T., Rhee, J.-S., Raisuddin, S., Lee, J.S. (2008). Characterization of the glutathione S-transferase-Mu (GSTM) gene sequence and its expression in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus* as a function of development, gender type and chemical exposure. *Chemico-Biological Interactions*, 174(2), 118–125. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2008.05.011>
- Yu, J., Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S71-83. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.45>
- Yu, R., Lei, W., Mandlekar, S., Weber, M. J., Der, C. J., Wu, J., Kong, A. N. (1999). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27545–27552. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27545>
- Zhang, S., Meng, J., Niu, Z., Huang, Y., Wang, J., Su, X., ... Wang, H. (2017). Zebrafish models for human ALA-dehydratase-deficient porphyria (ADP) and hereditary coproporphyria (HCP) generated with TALEN and CRISPR-Cas9. *BioRxiv*, 109553. <https://doi.org/10.1101/109553>
- Zhao, Z., Wu, Y.-K., Reece, E. A. (2008). Demonstration of the Essential Role of Protein Kinase C Isoforms in Hyperglycemia-Induced Embryonic Malformations. *Reproductive Sciences*, 15(4), 349–356. <https://doi.org/10.1177/1933719108316986>
- Zhou, R., Zhang, H., Wang, Z., Zhou, X., Si, J., Gan, L., ... Liu, Y. (2015). The developmental toxicity and apoptosis in zebrafish eyes induced by carbon-ion irradiation. *Life Sciences*, 139, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.08.014>
- Zhou, S., Dong, Q., Li, S., Guo, J., Wang, X., Zhu, G. (2009). Developmental toxicity of cartap on zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 95(4), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.006>
- Zhu, L., Mu, X., Wang, K., Chai, T., Yang, Y., Qiu, L., Wang, C. (2015). Cyhalofop-butyl has the potential to induce developmental toxicity, oxidative stress and apoptosis in early life stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 203, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.044>
- Zhu, S., Korzh, V., Gong, Z., Low, B. C. (2008). RhoA prevents apoptosis during zebrafish embryogenesis through activation of Mek/Erk pathway. *Oncogene*, 27(11), 1580–1589. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210790>

Zipper, L M, Mulcahy, R. T. (2000). Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(2), 484–492.

<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3830>

Zipper, Laurie M, Mulcahy, R. T. (2003). Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 73(1), 124–134.

<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg083>

Zukaite, V., Cook, R. T., Walker, A. J. (2016). Multiple roles for protein kinase C in gastropod embryogenesis. *Cell and Tissue Research*, 364(1), 117–124.

<https://doi.org/10.1007/s00441-015-2288-3>

<https://zfin.org/>

Slike iz poglavlja 1. Uvod (1.1 – 1.5; 1.7 – 1.10) su preuzete sa interneta iz naučnih radova koji imaju licencu koja dopušta deljenje, modifikovanje i umnožavanje slika (*Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International* licenca, *Open access* časopisi i sl.) ili je dobijena dozvola za korišćenje u doktorskoj disertaciji putem *Copyright Clearance Center's RightsLink* (za sliku 1.6).

LISTA SKRAĆENICA

18s	18s ribozomska RNK
AHR	aril hidrokarbonski receptor
AKT/PKB	proteinska kinaza B
AO	akridin oranž
AP-1	aktivator proteina 1
APAF-1	(engl. <i>apoptotic protease activating factor 1</i>)
aPKCs	atipične protein kinaze C (engl. <i>atypical PKCs</i>)
ARE	(engl. <i>antioxidant response element</i>)
BAK	(engl. <i>BCL2-antagonist/killer 1</i>)
BAX	(engl. <i>BCL2 associated X</i>)
BCL-2	(engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BSA	goveđi serum albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
C10	mišija alveolarna epitelijalna ćelijska linija
cAMP	ciklični adenzin monofosfat (engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CASP	kaspaza (engl. <i>caspase</i>)
CAT	katalaza (engl. <i>catalase</i>)
cGSTs	citoplazmatske glutation S-transferaze
CNS	centralni nervni sistem
cPKCs	klasične protein kinaze C (engl. <i>conventional PKCs</i>)
CRE	(engl. <i>cAMP response element</i>)
CRE	(engl. <i>cAMP response element</i>)
CREB	(engl. <i>cAMP response element-binding protein</i>)
CYP	citohrom P450 (engl. <i>cytochrome P450</i>)
CytC	citohrom c (engl. <i>cytochrome c</i>)
DAG	diacilglicerol
DEPC	dietilpirokarbonatom (engl. <i>diethyl pyrocarbonate</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
dpf	(engl. <i>days post fertilization</i>)
DTT	ditiotreitrol

EDC	endokrini ometači (engl. <i>endocrine disrupting chemicals</i>)
Ef1 α	elongacioni faktor 1 α
EpRE	(engl. <i>electrophile-responsive element</i>)
ERK	ekstraćelijskim signalima regulisane kinaze 1/2 (engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
EtBr	etidijum bromid
Fors	forskolin
Gapdh	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (engl. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GPCR	(engl. <i>G protein-coupled receptor</i>)
GPX1	glutation peroksidaza 1 (engl. <i>glutation peroxidase 1</i>)
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
GST	glutation S-transferaza
GSTA	klasa <i>Alpha</i> glutation S-transferaza
GSTM	klasa <i>Mu</i> glutation S-transferaza
GSTP	klasa <i>Pi</i> glutation S-transferaza
HepG2	hepatoma ćelijska linija
HMOX	hem oksigenaza (engl. <i>heme oxygenase</i>)
hpf	(engl. <i>hours post fertilization</i>)
HRP	(engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
hsp	protein toplotnog stresa (engl. <i>heat shock protein</i>)
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
JNK	(engl. <i>C-Jun N-terminal kinases</i>)
kDNK	komplementarna DNK (engl. <i>complementary DNA</i>)
Keap1	(engl. <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>)
kGSTs	mitohondrijske glutation S-transferaze
MAPEG	mikrozomalne glutation S-transferaze (engl. <i>membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione</i>)
MAPK	mitogenima aktivirane proteinske kinaze
MCF10A	humane epitelne ćelije dojke
MDM2	E3 ubikvitin protein ligaza (engl. <i>mouse double minute 2</i>)

MDR	(engl. <i>multidrug resistance-associated proteins</i>)
MEK	(engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
<i>mitfa</i>	(engl. <i>microphthalmia-associated transcription factor</i>)
MKK	(engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>)
MYR-AKT	konstitutivna aktivna forma Akt (engl. <i>myristoylated Akt</i>)
MZT	(engl. <i>maternal to zygotic transition</i>).
NADH	(engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADPH	(engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NF- κ B	nuklearni faktori kappa B
NGN1	neurogenin 1
nPKCs	nove protein kinaze C (engl. <i>novel PKCs</i>)
NQO	(engl. <i>NAD(P)H:quinine oxidoreductases</i>)
NRF2	(engl. <i>Nuclear factor-like 2; nfe212</i>)
OTX2	(engl. <i>orthodenticle homeobox 2</i>)
pAkt	fosforilisan protein Akt (engl. <i>phospho-Akt</i>)
PAX	(engl. <i>paired box</i>)
PBS	(engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PC-3	kancerske ćelije humane prostate
PC12	ćelijska linija feohromocitoma pacova
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pCreb	fosforilisan protein Creb (engl. <i>phospho-Creb</i>)
PDK	(engl. <i>phospholipid dependent protein kinase</i>)
PE	mišiji keratociti
pErk	fosforilisan protein Erk (engl. <i>phospho-Erk</i>)
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PKA	protein kinaze A
PKC	protein kinaza C
PLC	fosfolipaza C (engl. <i>phospholipase C</i>)
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat (engl. <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
PRE	(engl. <i>PMA-response element</i>)
PUMA	(engl. <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>)
PVDF	poliviniliden difluorid

PXR	(engl. <i>pregnane X Receptor</i>)
qRT-PCR	(engl. <i>quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>)
ROS	reaktivne kiseonične čestice (engl. <i>Reactive oxygen species</i>)
SDS	natrijum dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	standardna greška srednje vrednosti (eng. <i>standard error of the mean</i>)
SOD2	superoksid dismutaza 2
SOX	(engl. <i>SRY-related HMG-box</i>)
SYN2A	(engl. <i>Synapsin II a</i>)
tAkt	ukupan Akt (engl. <i>total Akt</i>)
tBHQ	<i>tert</i> -butilhidrokinon (engl. <i>tert-Butylhydroquinone</i>)
TBS	(engl. <i>TRIS buffered saline</i>)
TCDD	tetrahlorodibenzodioxin (engl. <i>2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamin
tErk	ukupan Erk (engl. <i>total Erk</i>)
TKR	receptor tirozin kinaze (engl. <i>tyrosine kinase receptor</i>)
TRIS	(engl. <i>tris-(hydroxymehtyl)-aminomethane</i>)
VEGFR	(engl. <i>vascular endothelial growth factors receptor</i>)
Vort	vortmanin (engl. <i>Wortmannin</i>)
XRE	(engl. <i>xenobiotic response element</i>)

BIOGRAFIJA

Jelena Petrović (rođena Hrubik) je rođena 23.02. 1985. godine u Sremskoj Mitrovici. Osnovnu školu „Jovan Veselinov Žarko“ završila je u Šidu, a gimnaziju „Jovan Jovanović Zmaj” u Novom Sadu.

Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog – molekularni biolog, upisuje 2004. godine, a završava 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,50. Master studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog – master, molekularni biolog upisuje 2008. godine, a završava 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,67. Diplomski i završni (master) rad uradila je pod mentorstvom prof. dr Radmile Kovačević, a ticali su se procene citotoksičnosti ekstrakata mirte i eukaliptusa na pacovske i humane ćelijske linije. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Molekularna biologija eukariota upisala je 2009. godine, sa ponovnim upisom 2017. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je u Laboratoriji za ekotoksikologiju, Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu pod mentorstvom docenta dr Nebojše Andrića. Za vreme studija bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj, kao i Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka.

Tokom zaposlenja na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, kao istraživač-pripravnik od 2011. godine, a zatim i istraživač-saradnik od 2013. godine učestvovala je na dva nacionalna i četiri međunarodna projekta iz oblasti fiziologije životinja. Jelena Petrović je do sada objavila 12 radova u međunarodnim i domaćim časopisima (3 kao prvi autor) i veći broj saopštenja, usmenih izlaganja i poster prezentacija na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Trenutno je zaposlena kao stručni saradnik u Sektoru za genetička i fizičko-hemijska ispitivanja u SP laboratoriji a.d. u Bečeju.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Петровић

број индекса M3008/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Улоге сигналних путева киназе регулисане екстрацелуларним сигнаlima, протеинских киназа РКВ и РКС у развоју и експресији гена ембриона рибе зебрице“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Петровић

Број индекса M3008/2017

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада „Улоге сигналних путева киназе регулисане екстрацелуларним сигнаlima, протеинских киназа РКВ и РКС у развоју и експресији гена ембриона рибе зебрице“

Ментор доцент др Небојша Андрић и проф. Др Гордана Матић

Потписани/а Јелена Петровић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Улоге сигналних путева киназе регулисане екстрацелуларним сигнаlima, протеинских киназа РКВ и РКС у развоју и експресији гена ембриона рибе зебрице“

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.