РЕГИСТРАЦИЯ ДИНАМИКИ СООТНОШЕНИЯ НАД⁺/НАДН В ТКАНЯХ ЭМБРИОНОВ РЫБ *DANIO RERIO* С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО БИОСЕНСОРА

Д. С. Билан^{1,2}, А. Г. Шохина¹, А. С. Панова^{1,3}, В. В. Белоусов^{1,2}

¹ Лаборатория молекулярных технологий,

Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

² Отдел нейро-компьютерных интерфейсов, НИИ трансляционной медицины,

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

³ Кафедра биохимии, биологический факультет,

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Рыба *Danio rerio* является популярным модельным объектом во многих медико-биологических исследованиях, в том числе для моделирования человеческих заболеваний и скрининга лекарственных препаратов. Генетически кодируемые биосенсоры на базе флуоресцентных белков широко используются во всем мире для исследований сложных биологических процессов в живых системах любого уровня сложности *in vivo*. Главное преимущество таких молекулярных инструментов в том, что генетически кодируемые индикаторы позволяют исследователям наблюдать за биологическими процессами в интактных системах в режиме реального времени. В данной работе мы впервые протестировали биосенсор SoNar для регистрации такого важного внутриклеточного параметра, как соотношение НАД⁺/НАДН, в тканях эмбрионов рыбы *D. rerio*. Мы исследовали, как изменяется динамика соотношения НАД⁺/НАДН в желточном мешке и тканях тела малька рыбы при инъекции продуктов гликолиза лактата и пирувата.

Ключевые слова: генетически кодируемые биосенсоры, Danio rerio, пируват, лактат

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований мол_а_дк № 16-34-60175 и гранта Президента РФ № МК-6339.2016.4, а также с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.

Для корреспонденции: Белоусов Всеволод Вадимович ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; belousov@ibch.ru

Статья получена: 05.12.2017 Статья принята к печати: 25.12.2017

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.005

OBSERVING THE DYNAMICS OF THE NAD⁺ TO NADH RATIO IN *DANIO* RERIO EMBRYO TISSUES USING A GENETICALLY ENCODED BIOSENSOR

Bilan DS^{1,2}, Shokhina AG¹, Panova AS^{1,3}, Belousov W^{1,2} ⊠

¹ Laboratory of Molecular Technologies,

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

² Department of Brain-Machine Interfaces, Research Institute of Translational Medicine,

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Department of Biochemistry, Faculty of Biology,

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The zebrafish *Danio rerio* is a popular model species for biomedical research focusing on modeling human diseases and screening of therapeutic drugs. Genetically encoded biosensors based on fluorescent proteins are widely used in many laboratories worldwide to study the biology of living systems of various complexity *in vivo*. The main advantage of these molecular tools is that they allow observing biological processes in intact systems in real time. In the present work we study the dynamics of the intracellular ratio of NAD⁺ to NADP in the yolk sac and tissues of *D. rerio* larvae using the SoNar biosensor following the injection of glycolisis end products, lactate and pyruvate.

Keywords: genetically encoded biosensors, Danio rerio, pyruvate, lactate

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant 16-34-60175) and the Russian Federation Presidential Grant MK-6339.2016.4. Experiments were partially carried out using the equipment provided by the IBCH core facility (CKP IBCH, supported by Russian Ministry of Education and Science, grant RFMEFI62117X0018).

Correspondence should be addressed: Vsevolod Belousov

ul. Miklukho-Maklaya, d. 16/10, Moscow, Russia, 117997; belousov@ibch.ru Recieved: 05.12.2017 Accepted: 25.12.2017

DOI: 10.24075/brsmu.2018.005

Рыба Danio rerio используется в качестве модельного объекта во многих современных медико-биологических исследованиях *in vivo*. По сравнению с другими лабораторными животными *D. rerio* имеет ряд преимуществ: рыб легко содержать в лабораторных условиях, при этом они дают большое количество потомства, которое быстро развивается. Из-за прозрачности тканей на ранних стадиях раз-

вития данный объект хорошо подходит для микроскопии. Кроме того, геном этого организма хорошо изучен, что позволяет легко осуществлять различные генные модификации. Благодаря этим достоинствам *D. rerio* часто используют для изучения функций генов, а также в исследованиях в области биологии развития позвоночных. Поскольку биохимические процессы и функциональная активность белков в клетках рыбы имеют много общего с процессами и активностью белков в клетках млекопитающих, *D. rerio* успешно применяют для моделирования человеческих заболеваний, а также скрининга лекарственных препаратов и тестирования токсичности соединений на стадии доклинических испытаний.

За последние годы на основе рыбы D. rerio было смоделировано много заболеваний. В качестве примеров можно привести острый лимфобластный лейкоз [1-3], меланому [4, 5], мышечную дистрофию [6], сахарный диабет [7], заболевания различных органов, включая сердце [8-10], почки [11, 12], заболевания центральной нервной системы [13, 14], в том числе ишемию головного мозга [15, 16]. Используя такие модели, можно исследовать, как влияют разные химические соединения на изучаемый физиологический или патологический процессы. В самом простом варианте тестируемое соединение может быть добавлено непосредственно в воду, поскольку вещество попадет в кровь животного через жабры. Однако большинство исследований проводят на мальках D. rerio, поэтому эффективную доставку вещества в организм можно осуществить напрямую с помощью его инъекции в желточный мешок эмбриона. Например, в ряде работ таким образом исследовали кардиотоксичный эффект некоторых препаратов (аспирин, кломипрамин, нимодипин, верапамил и др.) [17, 18]. Кроме этого, в мальков можно инъецировать метаболиты, которые в норме участвуют в различных биохимических процессах, как, например, глюкоза, которую вводили в эмбрион в многократном избытке для изучения профиля экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм углеводов [19]. Кроме молекул различных веществ в мальков D. rerio инъецировали клетки других организмов: бактериальные клетки для наблюдения за развитием инфекции [20-22] и даже клетки млекопитающих для исследования роста опухолей определенного вида [23, 24].

Исследования физиологических и патологических процессов in vivo вышли на новый уровень с появлением генетически кодируемых биосенсоров на основе флуоресцентных белков. Каждый такой биосенсор представляет собой химерную белковую молекулу, которая, как правило, состоит из сенсорной и флуоресцентной частей. Сенсорный домен чувствителен к изменению определенного биологического параметра, например внутриклеточной концентрации интересующего соединения. При этом флуоресцентная часть биосенсора позволяет визуализировать взаимодействие сенсорного домена и соединения и интерпретировать полученный сигнал. Такие биосенсоры кодируются геном, который можно внести в любой живой организм. Главное преимущество этого подхода заключается в том, что регистрацию интересующего параметра можно осуществлять в живом объекте в режиме реального времени [25]. Во многих случаях генетически кодируемые биосенсоры являются безальтернативным методом исследования сложных биологических процессов. Флуоресцентные биосенсоры неоднократно применяли в модельном объекте D. rerio, в том числе для изучения процессов эмбриогенеза [26], воспаления [27], регенерации органов [28].

В настоящей работе мы впервые протестировали генетически кодируемый биосенсор SoNar [29] для регистрации цитоплазматического окислительно-восстановительного статуса никотинамидадениндинуклеотида (НАД(Н)) в тканях *D. rerio*. Соотношение окисленной формы (НАД+) и восстановленной (НАДН) имеет важнейшее значение не только для энергетического метаболизма клетки, но и регуляции многих сигнальных каскадов [30–32]. Мы также установили, как соотношение НАД⁺/НАДН изменяется в желточном мешке и теле эмбриона D. rerio при инъекции таких важных метаболитов, как лактат и пируват.

Биосенсор SoNar [29] был создан на основе бактериального белка T-Rex из Thermus aquaticus, который является важным регулятором транскрипции некоторых ферментов в ответ на изменение внутриклеточного соотношения НАД+/НАДН. В подвижную область этого белка был интегрирован флуоресцентный белок срҮГР. Конформационные изменения, которые происходят при связывании белком T-Rex НАД+ или НАДН, передаются на флуоресцентный белок, изменяя его спектральные свойства (рис. 1). Для спектра возбуждения флуоресценции SoNar характерно наличие двух пиков в области 420 и 490 нм, при этом для сенсора характерен один пик эмиссии с максимумом 518 нм. Сигнал биосенсора рассчитывается как соотношение значений интенсивности флуоресценции, независимо возбуждаемой при 420 и 490 нм (F₄₀₀/F₄₀₀) [29]. Таким образом, сигнал имеет рациометрический характер, что особенно важно при работе in vivo, поскольку позволяет избежать артефактов, связанных с разным уровнем экспрессии сенсора в разных клетках, подвижностью объекта и изменением его формы, толщиной тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рыбы *Danio rerio* линии AB/TL содержались в специально оборудованном помещении при 26,5 °C с заданным режимом день–ночь 12 : 12. Все эксперименты над животными осуществляли в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Для получения потомства родительских особей *D. rerio* за 4 ч до завершения светового дня попарно отсаживали в отдельные контейнеры, содержавшие по 500 мл среды E3. С наступлением светового дня собирали икру животных.

Для получения мальков *D. rerio*, экспрессирующих в тканях нужные генетически кодируемые биосенсоры (в работе использовали биосенсоры SoNar [29] и SypHer-2 [33]), мы нарабатывали *in vitro* их мPHK, используя коммерческий набор mMessage mMachine SP6 Transcription kit



Рис. 1. Спектр возбуждения флуоресценции белкового препарата биосенсора SoNar. Для спектра возбуждения флуоресценции характерно наличие двух пиков с максимумами 420 и 490 нм. При добавлении к белку НАДН в его спектре происходит увеличение интенсивности в области 420 нм и, наоборот, уменьшение в области 490 нм. В присутствии НАД⁺ возрастает интенсивность в области 490 нм. Для биосенсора SoNar характерно наличие одного пика эмиссии флуоресценции с максимумом в области 518 нм

(Ambion, США). Далее 1 нл мРНК интересующего биосенсора с концентрацией 0,1 мкг/мкл инъецировали в желточные мешки эмбрионов рыб на стадии одной клетки с помощью микроинъектора Eppendorf Microinjector 5242. Инъецированные эмбрионы далее содержали в чашках Петри при 26,5 °С в комнате с заданным режимом деньночь 12: 12. Через 24 ч после микроинъекции эмбрионы скринировали под флуоресцентным микроскопом и отбирали флуоресцирующих. Перед микроскопией отобранные эмбрионы вручную извлекали из хорионов, обездвиживали в 0,02 % растворе трикаина и заключали в капле 1,5 % легкоплавкой агарозы. Растворы метаболитов (лактата натрия и пирувата натрия) инъецировали в желточные мешки обездвиженных мальков в объеме 1 нл раствора концентрацией 200 мМ. Предварительно в экспериментах регистрировали исходные значения сигналов биосенсоров в выбранных областях каждой особи.

Микроскопию рыб проводили с помощью широкопольного флуоресцентного микроскопа Leica DM6000 (Leica, Германия), оснащенного объективом HC PL FLUOTAR 10.0*0.30 DRY. Для возбуждения флуоресценции использовали фильтры СFP BP436/20 и GFP BP470/40 (Leica). Режим съемки составлял 1 кадр в минуту.

Обработку изображений данных, полученных с помощью микроскопа, выполняли с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH). Построение графиков динамики изменения сигнала сенсоров и статистическую обработку данных в каждой временной точке проводили с помощью программы OriginPro 8.6 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы протестировали работу генетически кодируемого биосенсора SoNar [29] для регистрации соотношения НАД⁺/ НАДН в тканях рыбы *D. rerio*. Для этого мы наработали мРНК биосенсора и инъецировали ее в желточные мешки эмбрионов рыб на стадии одной клетки. Через сутки с помощью флуоресцентного микроскопа мы отобрали флуоресцирующих особей для дальнейшей микроскопии. Регистрацию флуоресценции SoNar проводили в двух независимых каналах микроскопа, возбуждение флуоресценции в каждом из которых соответствует двум пикам



Рис. 2. Динамика изменения соотношения НАД⁺/НАДН и pH в тканях однодневных эмбрионов *D. rerio* до и после инъекции в желточный мешок растворов пирувата и лактата. (А и Г) Фотографии фрагментов тела малька *D. rerio* до и после инъекции 1 нл 200 мМ раствора лактата (А) и пирувата (Г). Фотографии раскрашены в псевдоцвета, которые соответствуют значению сигнала биосенсора SoNar (F₄₂₀/F₄₉₀). Области 1 и 2, отмеченные белым кругом на первой фотографии, обозначают участки на теле малька, в пределах которых регистрировалось изменение F₄₂₀/F₄₉₀. Области 1 и 2, отмеченные белым кругом на первой фотографии, обозначают участки на теле малька, в пределах которых регистрировалось изменение F₄₂₀/F₄₉₀. На других рыбах выбирали аналогичные области. (Б и Д) Динамика изменения соотношения НАД⁺/НАДН, регистрируемая с помощью биосенсора SoNar, в желточном мешке (красная линия) и теле (черная линия) малька *D. rerio* до и после инъекции растворов лактата (Б) и пирувата (Д). (В и Е) Динамика изменения pH, регистрируемая с помощью биосенсора SoNar, в желточном мешке (красная линия) и теле (черная линия) малька *D. rerio* до и после инъекции растворов лактата (Б) и пирувата (Д). (В и Е) Динамика изменения pH, регистрируемая с помощью биосенсора SoNar, в желточном мешке (красная линия) и теле (черная линия) малька *D. rerio* до и после инъекции растворов лактата (Б) и пирувата (Д). (В и Е) Динамика изменения pH, регистрируемая с помощью биосенсора SypHer2, в желточном мешке (красная линия) и теле (черная линия) малька *D. rerio* до и после инъекции растворов лактата (В) и пирувата (Д, гей о до после инъекции растворов лактата (В) и пирувата (Д, в с с графика (Б, В, Д, Е) планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению среднего значения. График (Б) построен по результатам, полученным на 11 животных; графики (В) и (Е) построены по результатам, полученным на 6 животных для каждого

биосенсора в его спектре возбуждения флуоресценции (рис. 1). Для этого мы получали изображение рыбы с возбуждением флуоресценции при 420 нм (F₄₂₀) и отдельно — изображение этой же рыбы при возбуждении флуоресценции в области 490 нм (F₄₉₀). Далее с помощью программного обеспечения ImageJ мы делили изображения двух каналов друг на друга и в результате получали изображение рыбы, которое раскрашивали в псевдоцвета, соответствующие значениям соотношения F₄₂₀/F₄₉₀ (рис. 2, А, Г). Далее с помощью программы ImageJ на теле малька выбирали области, для которых производили расчеты. Графики, которые отображают в отмеченных областях динамику изменения соотношения F₄₂₀/F₄₉₀, строили с помощью программы OriginPro 8.6.

Для регистрации динамики изменения соотношения НАД+/НАДН с помощью биосенсора SoNar в тканях малька D. rerio мы использовали пируват и лактат. Известно, что метаболическая пара лактат/пируват находится в равновесии со свободными формами НАД+/НАДН в цитоплазме клеток благодаря реакции, катализируемой ферментом лактатдегидрогеназой [34, 35]. Поэтому в желточные мешки 10 эмбрионов D. rerio мы инъецировали по 1 нл 200 мМ раствора лактата натрия и других 11 мальков — также по 1 нл 200 мМ раствора пирувата натрия. Во всех случаях мы предварительно регистрировали в динамике сигнал биосенсора в тканях до инъекции. Стартовое значение сигнала биосенсора мы приравнивали к 1. После инъекции мальков как можно быстрее вновь помещали под флуоресцентный микроскоп и возобновляли съемку при тех же настройках. В случае с инъекцией лактата в желточном мешке и теле эмбриона наблюдалось значительное увеличение сигнала F_{420}/F_{490} , что свидетельствовало о восстановлении пула НАД(Н) (рис. 2, Б). Одинаковую динамику изменения сигнала биосенсора в различных областях тела животного можно объяснить быстрой доставкой веществ из желточного мешка в другие органы. Сигнал достигал своего максимального значения уже через 5 мин с момента инъекции, после чего снижался примерно до своего первоначального значения в течение 30 мин, поскольку лактат метаболизировался клеточными системами. При инъекции в желточные мешки эмбрионов рыб раствора пирувата мы ожидали увидеть обратный эффект. Однако сигнал биосенсора SoNar (F420/F490) уменьшился лишь в желточном мешке мальков, в то время как в теле животных он даже незначительно возрастал (рис. 2, Д). Это означает, что при инъекции пирувата в разных органах малька рыбы происходят противоположно направленные окислительно-восстановительные события с внутриклеточным пулом НАД(Н): окисление в желточном мешке и незначительное восстановление в теле эмбриона.

Транспорт лактата и пирувата в клетки может сопровождаться изменением значения pH, поскольку осуществляется в симпорте с H⁺ [36, 37]. Из-за структурных особенностей хромофора флуоресцентные белки чувствительны к изменениям pH окружения [38]. Чтобы оценить возможное влияние pH на динамику изменения сигнала SoNar в нашем эксперименте, в качестве контроля мы использовали биосенсор SypHer2, ранее разработанный в нашей лаборатории для регистрации pH [33]. Мы получили мPHK биосенсора SypHer2 и провели аналогичную серию экспериментов. Инъекции растворов лактата и пирувата не вызывали изменений pH в теле мальков. В желточном мешке оба метаболита вызывали лишь незначительное повышение pH, процесс развивался медленно в течение примерно 20 мин с момента инъекции (рис. 2, B, E).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты позволяют заключить, что генетически кодируемый биосенсор SoNar для регистрации динамики изменения соотношения НАД⁺/НАДН успешно может быть использован в исследованиях на моделях рыбы *D. rerio*. Этот важнейший биологический параметр может сильно изменяться при разнообразных патологических состояниях клеток. Используя модель определенного заболевания на рыбе *D. rerio*, конкретные ткани или клетки которой экспрессируют биосенсор SoNar, можно эффективно оценивать влияние различных веществ на соотношение НАД⁺/НАДН и, следовательно, на изучаемый патологический процесс.

Мы наблюдали, что инъекция лактата в желточный мешок эмбриона D. rerio приводит к значительному и одновременному восстановлению пула НАД(Н) во всех тканях организма рыбы. Однако инъекция пирувата вызвала окисление пула НАД(Н) лишь в желточном мешке, в то время как в теле эмбриона наблюдалось даже незначительное восстановление. В одной из недавних работ на модели D. rerio исследовали роль окислительно-восстановительных процессов при эмбриогенезе. Было показано, что мощное окисление происходит с момента начала стадии гаструлы, которое уменьшается лишь к достижению мальком возраста 3 дней. В этой работе было показано, что окислительный стресс играет ключевую роль в развитии некоторых органов в ходе эмбриогенеза [26]. Можно предположить, что мы не увидели значительного окисления в тканях тела эмбриона рыбы после инъекции пирувата, поскольку на этой стадии развития в тканях эмбриона многие окислительно-восстановительные процессы уже смещены в сторону окисления. Примечательно, что в приведенной нами статье, в которой исследовали окислительно-восстановительные процессы при эмбриогенезе, наименьший уровень активных форм кислорода, в частности пероксида водорода, наблюдался в желточном мешке, в котором мы как раз наблюдали динамику окисления НАД(Н) после инъекции пирувата. Незначительное восстановление пула НАД(Н) в теле малька при этом можно объяснить влиянием компенсаторных биохимических процессов.

Альтернативное объяснение состоит в том, что в желточном мешке пируват восстанавливается до лактата, что подтверждается падением концентрации НАДН, но в тело малька предпочтительнее транспортируется именно лактат, благодаря чему мы регистрировали изменение сигнала биосенсора в сторону незначительного роста концентрации НАДН. Однако подтверждение этих гипотез требует проведения отдельного исследования.

выводы

В нашей работе мы впервые показали, что генетически кодируемый биосенсор SoNar для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН может быть использован в тканях *D. rerio*. Инъекция лактата в желточный мешок однодневных эмбрионов рыб приводит к быстрому восстановлению пула НАД(Н) во всех тканях животного, таким образом, пул веществ в желточном мешке хорошо сообщается с другими тканями. Инъекция пирувата вызвала окисление лишь в желточном мешке, в то время как в теле малька наблюдалось незначительное восстановление. Используя биосенсор SypHer2, мы установили, что при инъекции пирувата и лактата незначительные изменения рН происходят только в желточном мешке.

Литература

- Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, Kutok JL, Aster JC, Kanki JP et al. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. Science. 2003 Feb 7; 299 (5608): 887–90. DOI: 10.1126/science.1080280.
- Chen J, Jette C, Kanki JP, Aster JC, Look AT, Griffin JD. NOTCH1induced T-cell leukemia in transgenic zebrafish. Leukemia. 2007 Mar; 21 (3): 462–71. DOI: 10.1038/sj.leu.2404546.
- Feng H, Stachura DL, White RM, Gutierrez A, Zhang L, Sanda T et al. T-lymphoblastic lymphoma cells express high levels of BCL2, S1P1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. Cancer Cell. 2010 Oct 19; 18 (4): 353–66. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.09.009.
- Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. Curr Biol. 2005 Feb 8; 15 (3): 249–54. DOI: 10.1016/j. cub.2005.01.031.
- Santoriello C, Gennaro E, Anelli V, Distel M, Kelly A, Koster RW et al. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. PloS One. 2010 Dec 10; 5 (12): e15170. DOI: 10.1371/journal.pone.0015170.
- Bassett DI, Currie PD. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. Hum Mol Genet. 2003 Oct 15; 12 Spec No 2: R265–70. DOI: 10.1093/hmg/ddg279.
- Zang L, Shimada Y, Nishimura N. Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus. Sci Rep. 2017 May 3; 7 (1): 1461. DOI: 10.1038/s41598-017-01432-w.
- Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE et al. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. Development. 1996 Dec; 123: 285–92.
- Asnani A, Peterson RT. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. Dis Models Mech. 2014 Jul; 7 (7): 763–7. DOI: 10.1242/dmm.016170.
- Chablais F, Veit J, Rainer G, Jazwinska A. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. BMC Dev Biol. 2011 Apr 7; 11: 21. DOI: 10.1186/1471-213X-11-21.
- Morales EE, Wingert RA. Zebrafish as a model of kidney disease. Results Probl Cell Differ. 2017; 60: 55–75. DOI: 10.1007/978-3-319-51436-9_3.
- Swanhart LM, Cosentino CC, Diep CQ, Davidson AJ, de Caestecker M, Hukriede NA. Zebrafish kidney development: basic science to translational research. Birth Defects Res C Embryo Today. 2011 Jun; 93 (2): 141–56. DOI: 10.1002/bdrc.20209.
- Martin-Jimenez R, Campanella M, Russell C. New zebrafish models of neurodegeneration. Curr Neurol Neurosci Rep. 2015 Jun; 15 (6): 33. DOI: 10.1007/s11910-015-0555-z.
- Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. Curr Neurol Neurosci Rep. 2011 Jun; 11 (3): 274–82. DOI: 10.1007/s11910-011-0182-2.
- Yu X, Li YV. Zebrafish as an alternative model for hypoxic-ischemic brain damage. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2011; 3 (2): 88–96. Epub 2011 Apr 20.
- Yu X, Li YV. Zebrafish (Danio rerio) developed as an alternative animal model for focal ischemic stroke. Acta Neurochir Suppl. 2016; 121: 115–9. DOI: 10.1007/978-3-319-18497-5_20.
- Zhu JJ, Xu YQ, He JH, Yu HP, Huang CJ, Gao JM et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. J Appl Toxicol. 2014; 34 (2): 139–48. DOI: 10.1002/jat.2843.
- Liang J, Jin W, Li H, Liu H, Huang Y, Shan X, et al. In vivo cardiotoxicity induced by sodium aescinate in zebrafish larvae. Molecules. 2016 Feb 23; 21 (3): 190. DOI: 10.3390/ molecules21030190.
- Rocha F, Dias J, Engrola S, Gavaia P, Geurden I, Dinis MT et al. Glucose overload in yolk has little effect on the long-term modulation of carbohydrate metabolic genes in zebrafish (Danio rerio). J Exp Biol. 2014 Apr 1; 217 (Pt 7): 1139–49. DOI: 10.1242/ jeb.095463.
- Cronan MR, Tobin DM. Fit for consumption: zebrafish as a model for tuberculosis. Dis Model Mech. 2014 Jul; 7 (7): 777–84. DOI: 10.1242/dmm.016089.

- Mostowy S, Boucontet L, Mazon Moya MJ, Sirianni A, Boudinot P, Hollinshead M et al. The zebrafish as a new model for the in vivo study of Shigella flexneri interaction with phagocytes and bacterial autophagy. PLoS Pathog. 2013; 9 (9): e1003588. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003588.
- Veneman WJ, Stockhammer OW, de Boer L, Zaat SA, Meijer AH, Spaink HP. A zebrafish high throughput screening system used for Staphylococcus epidermidis infection marker discovery. BMC Genomics. 2013 Apr 15; 14: 255. DOI: 10.1186/1471-2164-14-255.
- Yee NS, Kazi AA, Yee RK. Translating discovery in zebrafish pancreatic development to human pancreatic cancer: biomarkers, targets, pathogenesis, and therapeutics. Zebrafish. 2013 Jun; 10 (2): 132–46. DOI: 10.1089/zeb.2012.0817.
- Lee HJ, Yang YJ, Jeong S, Lee JD, Choi SY, Jung DW et al. Development of a vestibular schwannoma xenograft zebrafish model for in vivo antitumor drug screening. Laryngoscope. 2016 Dec; 126 (12): E409–E415. DOI: 10.1002/lary.26043.
- Bilan DS, Belousov W. New tools for redox biology: From imaging to manipulation. Free Radic Biol Med. 2017 Aug; 109: 167–88. DOI: 10.1016/freeradbiomed.2016.12.004.
- Gauron C, Meda F, Dupont E, Albadri S, Quenech'Du N, Ipendey E et al. Hydrogen peroxide (H2O2) controls axon pathfinding during zebrafish development. Dev Biol. 2016 Jun 15; 414 (2): 133–41. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.05.004.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. Nature. 2009 Jun 18; 459 (7249): 996–9. DOI: 10.1038/nature08119.
- Han P, Zhou XH, Chang N, Xiao CL, Yan S, Ren H et al. Hydrogen peroxide primes heart regeneration with a derepression mechanism. Cell Res. 2014 Sep; 24 (9): 1091–107. DOI: 10.1038/ cr.2014.108.
- Zhao Y, Hu Q, Cheng F, Su N, Wang A, Zou Y et al. SoNar, a highly responsive NAD+/NADH sensor, allows high-throughput metabolic screening of anti-tumor agents. Cell metab. 2015 May; 21 (5): 777–89. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.04.009.
- 30. Ying W. NAD+ and NADH in cellular functions and cell death. Front Biosci. 2006 Sep 1; 11: 3129–48.
- Ying W. NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. Antioxid Redox Signal. 2008 Feb; 10 (2): 179–206. DOI: 10.1089/ ars.2007.1672.
- Verdin E. NAD(+) in aging, metabolism, and neurodegeneration. Science. 2015 Dec 4; 350 (6265): 1208–13. DOI: 10.1126/ science.aac4854.
- 33. Matlashov ME, Bogdanova YA, Ermakova GV, Mishina NM, Ermakova YG, Nikitin ES et al. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology. Biochim Biophys Acta. 2015 Nov; 1850 (11): 2318–28. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.08.002.
- 34. Bucher T, Brauser B, Conze A, Klein F, Langguth O, Sies H. State of oxidation-reduction and state of binding in the cytosolic NADHsystem as disclosed by equilibration with extracellular lactatepyruvate in hemoglobin-free perfused rat liver. Eur J Biochem. 1972 May 23; 27 (2): 301–17.
- Williamson DH, Lund P, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem J. 1967 May; 103 (2): 514–27.
- Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. Am J Physiol. 1993 Apr; 264 (4 Pt 1): C761–82. DOI: 10.1152/ ajpcell.1993.264.4.C761.
- Zima AV, Kockskamper J, Mejia-Alvarez R, Blatter LA. Pyruvate modulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+ release in rats via mitochondria-dependent and -independent mechanisms. J Physiol. 2003; 550 (Pt 3): 765–83.
- Elsliger MA, Wachter RM, Hanson GT, Kallio K, Remington SJ. Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. Biochemistry. 1999 Apr 27; 38 (17): 5296–301. DOI: 10.1021/bi9902182.

References

- Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, Kutok JL, Aster JC, Kanki JP et al. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. Science. 2003 Feb 7; 299 (5608): 887–90. DOI: 10.1126/science.1080280.
- Chen J, Jette C, Kanki JP, Aster JC, Look AT, Griffin JD. NOTCH1induced T-cell leukemia in transgenic zebrafish. Leukemia. 2007 Mar; 21 (3): 462–71. DOI: 10.1038/sj.leu.2404546.
- Feng H, Stachura DL, White RM, Gutierrez A, Zhang L, Sanda T et al. T-lymphoblastic lymphoma cells express high levels of BCL2, S1P1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. Cancer Cell. 2010 Oct 19; 18 (4): 353–66. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.09.009.
- Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. Curr Biol. 2005 Feb 8; 15 (3): 249–54. DOI: 10.1016/j. cub.2005.01.031.
- Santoriello C, Gennaro E, Anelli V, Distel M, Kelly A, Koster RW et al. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. PloS One. 2010 Dec 10; 5 (12): e15170. DOI: 10.1371/journal.pone.0015170.
- Bassett DI, Currie PD. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. Hum Mol Genet. 2003 Oct 15; 12 Spec No 2: R265–70. DOI: 10.1093/hmg/ddg279.
- Zang L, Shimada Y, Nishimura N. Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus. Sci Rep. 2017 May 3; 7 (1): 1461. DOI: 10.1038/s41598-017-01432-w.
- Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE et al. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. Development. 1996 Dec; 123: 285–92.
- Asnani A, Peterson RT. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. Dis Models Mech. 2014 Jul; 7 (7): 763–7. DOI: 10.1242/dmm.016170.
- Chablais F, Veit J, Rainer G, Jazwinska A. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. BMC Dev Biol. 2011 Apr 7; 11: 21. DOI: 10.1186/1471-213X-11-21.
- Morales EE, Wingert RA. Zebrafish as a model of kidney disease. Results Probl Cell Differ. 2017; 60: 55–75. DOI: 10.1007/978-3-319-51436-9_3.
- Swanhart LM, Cosentino CC, Diep CQ, Davidson AJ, de Caestecker M, Hukriede NA. Zebrafish kidney development: basic science to translational research. Birth Defects Res C Embryo Today. 2011 Jun; 93 (2): 141–56. DOI: 10.1002/bdrc.20209.
- Martin-Jimenez R, Campanella M, Russell C. New zebrafish models of neurodegeneration. Curr Neurol Neurosci Rep. 2015 Jun; 15 (6): 33. DOI: 10.1007/s11910-015-0555-z.
- Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. Curr Neurol Neurosci Rep. 2011 Jun; 11 (3): 274–82. DOI: 10.1007/s11910-011-0182-2.
- Yu X, Li YV. Zebrafish as an alternative model for hypoxic-ischemic brain damage. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2011; 3 (2): 88–96. Epub 2011 Apr 20.
- Yu X, Li YV. Zebrafish (Danio rerio) developed as an alternative animal model for focal ischemic stroke. Acta Neurochir Suppl. 2016; 121: 115–9. DOI: 10.1007/978-3-319-18497-5_20.
- Zhu JJ, Xu YQ, He JH, Yu HP, Huang CJ, Gao JM et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. J Appl Toxicol. 2014; 34 (2): 139–48. DOI: 10.1002/jat.2843.
- Liang J, Jin W, Li H, Liu H, Huang Y, Shan X, et al. In vivo cardiotoxicity induced by sodium aescinate in zebrafish larvae. Molecules. 2016 Feb 23; 21 (3): 190. DOI: 10.3390/ molecules21030190.
- Rocha F, Dias J, Engrola S, Gavaia P, Geurden I, Dinis MT et al. Glucose overload in yolk has little effect on the long-term modulation of carbohydrate metabolic genes in zebrafish (Danio rerio). J Exp Biol. 2014 Apr 1; 217 (Pt 7): 1139–49. DOI: 10.1242/ jeb.095463.
- Cronan MR, Tobin DM. Fit for consumption: zebrafish as a model for tuberculosis. Dis Model Mech. 2014 Jul; 7 (7): 777–84. DOI: 10.1242/dmm.016089.

- Mostowy S, Boucontet L, Mazon Moya MJ, Sirianni A, Boudinot P, Hollinshead M et al. The zebrafish as a new model for the in vivo study of Shigella flexneri interaction with phagocytes and bacterial autophagy. PLoS Pathog. 2013; 9 (9): e1003588. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003588.
- Veneman WJ, Stockhammer OW, de Boer L, Zaat SA, Meijer AH, Spaink HP. A zebrafish high throughput screening system used for Staphylococcus epidermidis infection marker discovery. BMC Genomics. 2013 Apr 15; 14: 255. DOI: 10.1186/1471-2164-14-255.
- Yee NS, Kazi AA, Yee RK. Translating discovery in zebrafish pancreatic development to human pancreatic cancer: biomarkers, targets, pathogenesis, and therapeutics. Zebrafish. 2013 Jun; 10 (2): 132–46. DOI: 10.1089/zeb.2012.0817.
- Lee HJ, Yang YJ, Jeong S, Lee JD, Choi SY, Jung DW et al. Development of a vestibular schwannoma xenograft zebrafish model for in vivo antitumor drug screening. Laryngoscope. 2016 Dec; 126 (12): E409–E415. DOI: 10.1002/lary.26043.
- Bilan DS, Belousov W. New tools for redox biology: From imaging to manipulation. Free Radic Biol Med. 2017 Aug; 109: 167–88. DOI: 10.1016/freeradbiomed.2016.12.004.
- Gauron C, Meda F, Dupont E, Albadri S, Quenech'Du N, Ipendey E et al. Hydrogen peroxide (H2O2) controls axon pathfinding during zebrafish development. Dev Biol. 2016 Jun 15; 414 (2): 133–41. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.05.004.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. Nature. 2009 Jun 18; 459 (7249): 996–9. DOI: 10.1038/nature08119.
- Han P, Zhou XH, Chang N, Xiao CL, Yan S, Ren H et al. Hydrogen peroxide primes heart regeneration with a derepression mechanism. Cell Res. 2014 Sep; 24 (9): 1091–107. DOI: 10.1038/ cr.2014.108.
- Zhao Y, Hu Q, Cheng F, Su N, Wang A, Zou Y et al. SoNar, a highly responsive NAD+/NADH sensor, allows high-throughput metabolic screening of anti-tumor agents. Cell metab. 2015 May; 21 (5): 777–89. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.04.009.
- 30. Ying W. NAD+ and NADH in cellular functions and cell death. Front Biosci. 2006 Sep 1; 11: 3129–48.
- Ying W. NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. Antioxid Redox Signal. 2008 Feb; 10 (2): 179–206. DOI: 10.1089/ ars.2007.1672.
- Verdin E. NAD(+) in aging, metabolism, and neurodegeneration. Science. 2015 Dec 4; 350 (6265): 1208–13. DOI: 10.1126/ science.aac4854.
- 33. Matlashov ME, Bogdanova YA, Ermakova GV, Mishina NM, Ermakova YG, Nikitin ES et al. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology. Biochim Biophys Acta. 2015 Nov; 1850 (11): 2318–28. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.08.002.
- 34. Bucher T, Brauser B, Conze A, Klein F, Langguth O, Sies H. State of oxidation-reduction and state of binding in the cytosolic NADHsystem as disclosed by equilibration with extracellular lactatepyruvate in hemoglobin-free perfused rat liver. Eur J Biochem. 1972 May 23; 27 (2): 301–17.
- Williamson DH, Lund P, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem J. 1967 May; 103 (2): 514–27.
- Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. Am J Physiol. 1993 Apr; 264 (4 Pt 1): C761–82. DOI: 10.1152/ ajpcell.1993.264.4.C761.
- Zima AV, Kockskamper J, Mejia-Alvarez R, Blatter LA. Pyruvate modulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+ release in rats via mitochondria-dependent and -independent mechanisms. J Physiol. 2003; 550 (Pt 3): 765–83.
- Elsliger MA, Wachter RM, Hanson GT, Kallio K, Remington SJ. Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. Biochemistry. 1999 Apr 27; 38 (17): 5296–301. DOI: 10.1021/bi9902182.