

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Reprodukční a vývojová biologie

Studijní obor:
Buněčná a vývojová biologie



Bc. Irem Mertová

Imunomodulační potenciál progenitorů Sertoliho buněk u pulců rodu *Xenopus*
v rámci hojení amputovaného ocasu

Immunomodulatory potential of Sertoli cell progenitors in *Xenopus* tadpoles
during the healing of amputated tail

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21. 4. 2022

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému školiteli doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a motivaci při vedení této práce. Mé obrovské díky patří také Zhao Qing Msc., která mi byla psychickou i pracovní oporou. Dále bych ráda poděkovala Bc. Světlaně Žabkové, RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D. a všem ostatním v naší laboratoři za jejich pomoc a vytvoření přátelského prostředí. Ráda bych také poděkovala Ing. Mgr. Jiřímu Vávrovi za jeho zaučení v laboratorních metodách v počátcích mého studia a za ochotnou pomoc při jakýchkoliv laboratorních nesnázích. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Ondřeji Šebestovi za odbornou pomoc při práci s konfokálním mikroskopem a katedře fyziologie za zapůjčení kryomikrotomu. Na závěr chci poděkovat mé rodině, přátelům a příteli za jejich ohromnou podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

V Laboratoři vývojové biologie byla založena buněčná kultura společných progenitorů Sertoliho a peritubulárních myoidních buněk odvozená z varlat samce *X. tropicalis*, zvaná XtiSC. XtiSC vykazují podobné vlastnosti jako známější mezenchymální kmenové buňky které jsou využívány v buněčné terapii pro své imunomodulační a proregenerativní vlastnosti.

Bylo prokázáno, že mikroinjekce XtiSC do dorzální žíly v ocasu pulců zvyšuje počty makrofágů 7 dní po amputaci ocasu (dpa), jak u kontrolních jedinců, tak u pulců po depleci makrofágů pomocí aplikace klotrosomů. Deplece makrofágů také snižuje migrační schopnost XtiSC k místu amputace ocasu. Deplece makrofágů také vedla ke snížení počtu satelitních buněk 1 dpa. Sedmý den po amputaci ocasu a injekci XtiSC došlo naopak k signifikantnímu zvýšení jejich počtu oproti kontrolní skupině bez injekce XtiSC.

S využitím DAF-2DA sondy byla potvrzená produkce oxidu dusnatého injikovanými XtiSC a v místě poranění. V rámci následného výzkumu proliferace, diferenciaci a migrace satelitních buněk *in vivo* byl vytvořen vektor exprimující EGFP pod endogením Pax7 promotorem a Katushka RFP pod gama-krystalinovým promotorem, který byl pomocí metody CRISPR-Cas9 integrován do genomu *X. tropicalis*. V současné době jsou k dispozici transgenní pulci s červenou fluorescencí v oku a zeleným fluorescenčním signálem v individuálních buňkách rozestých převážně ve svalovině a peritoneu pulců. Tito pulci budou dále analyzováni pro potvrzení specifity EGFP signálu.

Klíčová slova: imunomodulace, diferenciaci, progenitory Sertoliho buněk, *Xenopus*, poranění

Abstract

A cell culture of common Sertoli and peritubular myoid cells progenitors derived from the testes of male *X. tropicalis*, called XtiSC, was established in the Laboratory of Developmental Biology. XtiSCs exhibit similar properties as more well-known mesenchymal stem cells that are used in cell therapy for their immunomodulatory and proregenerative properties.

Microinjection of XtiSC into the dorsal vein of the tail of the tadpoles has increased macrophage numbers 7 days after tail amputation (dpa), both in controls and in tadpoles after depletion of macrophages by the application of clodrosomes. Macrophage depletion also reduces the migratory ability of XtiSC to the site of tail amputation. Macrophage depletion also led to a reduction in the number of satellite cells 1 dpa. On the seventh day after tail amputation and XtiSC injection, there was a significant increase in their number compared to the control group without XtiSC injection.

Using DAF-2DA probe, nitric oxide production was confirmed by injected XtiSC and at the injury site. For future research of the proliferation, differentiation and migration of satellite cells *in vivo*, a vector expressing EGFP under endogenous Pax7 promoter and Katushka-RFP under gamma-crystalline promoter was created and integrated into the *X. tropicalis* genome using the CRISPR-Cas9 method. Transgenic tadpoles with red fluorescence in the eye and a green fluorescent signal in individual cells scattered in the muscle and peritoneum of the tadpoles were recently created. These tadpoles will be further analyzed to confirm the specificity of the EGFP signal.

Key words: immunomodulation, differentiation, Sertoli cell progenitors, *Xenopus*, injury

Seznam zkratek

1 dpa	1 day post amputation	1 den po amputaci
3 dpa	3 days post amputation	3 dny po amputaci
7 dpa	7 days post amputation	7 dní po amputaci
BMP	bone morfogenic protein	
CRISPR	clustered regularly interspaced palindromic repeats	
DAF-2DA	diaminfluorescein 2-diacetate	diaminfluorescein 2-diacetát
DAF-2T	4,5-diaminofluorescein triazole	triazol fluorescein
EGF	epithelial growth factor	epiteliální růstový faktor
EGFP	enhanced green fluorescent protein	
GFP	green fluorescent protein	zelený flourescenční protein
HGF	hepatocyte growth factor	růstový faktor hepatocytů
HSC	hematopoietic stem cell	hematopoetická kmenová buňka
IFN- γ	interferon γ	interferon γ
IGF-1	insulin-like growth factor	
IL – 6	interleukin-6	interleukin-6
IL – 10	interleukin-10	interleukin-10
IL – 13	interleukin-13	interleukin-13
IVF	<i>in vitro</i> fertilization	<i>in vitro</i> fertilizace
MHC-II	major histocompatibility complex II	MHC glykoprotein II. třídy
MSC	mesenchymal stem cell	mezenchymální kmenová buňka
NGF	nerve growth factor	nervový růstový faktor

NHEJ	non-homologous end joining	
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
iNOS	inducible nitric oxide synthase	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
RFP	red fluorescent protein	červený fluorescenční protein
gRNA	guide RNA	naváděcí RNA
RNS	reactive nitrogen species	reaktivní druhy dusíku
ROC	regeneration-organizing cell	
ROS	reactive oxygen species	reaktivní oxidové radikály
TALENs	transcription activator-like effector nucleases	
TGF- β	transforming growth factor β	
3' UTR	3 prime untranslated region	3' nepřekládaná oblast
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endoteliální růstový faktor
XtiSC	<i>X. tropicalis</i> immature Sertoli cells	nezralé Sertoliho buňky <i>X. tropicalis</i>
XtTSCc	<i>X. tropicalis</i> testicular somatic cells	testikulární somatické buňky <i>X. tropicalis</i>

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1. Regenerace	3
2.2. Druhy regenerace	3
2.2.1. Epimorfóza	3
2.2.2. Morfalaxe	4
2.2.3. Kompenzační regenerace	4
2.3. <i>Xenopus tropicalis</i> a <i>Xenopus laevis</i>	5
2.4. Regenerace u žab rodu <i>Xenopus</i>	6
2.5. Kmenové buňky	9
2.6. Mezenchymální kmenové buňky (MSC)	9
2.7. Sertoliho buňky	10
2.8. Progenitory Sertoliho a myoidních buněk – XtiSC	11
2.9. Role imunitního systému v regeneraci	13
2.10. CRISPR-Cas9	16
3. Cíle práce	19
4. Materiál	20
4.1. Živý materiál	20
4.1.1. Pokusná zvířata	20
4.1.2. Buněčná kultura	20
4.2. Média	20
4.2.1. Kultivační médium	20
4.3. Roztoky	20
4.3.1. Roztoky pro IVF a mikroinjekce	20
4.4. Kity pro přípravu vektoru exprimujícího EGFP pod Pax7 promotorem	21
4.5. Ostatní materiál pro přípravu vektoru exprimujícího EGFP pod Pax7 promotorem	21
4.6. Primární a sekundární protilátky	21
4.7. Chemikálie	21
4.8. Použité přístroje	22
5. Metody	24
5.1. Kultivace XtiSC a jejich příprava pro mikroinjekce do krevního oběhu pulců	24
5.2. IVF	24
5.3. Mikroinjekce klodrosomů pro depleci makrofágů do krevního oběhu pulců	25

5.4.	Mikroinjekce XtiSC do krevního oběhu pulců	25
5.5.	Imunohistologické barvení kryomikrotomových řezu.....	26
5.6.	Studium produkce oxidu dusnatého po amputaci ocasu	27
5.7.	Studium migrace XtiSC do místa poranění po amputaci ocasu.....	27
5.8.	Pozorování schopnosti regenerace ocasu po amputaci.....	28
5.9.	Mikroinjekce roztoku pro CRISPR Cas9 obsahujícího DNA vektor, gRNA a Cas9 protein do 1 buněčného embrya <i>X. tropicalis</i>	29
5.10.	Statistická analýza	30
6.	Výsledky.....	31
6.1.	Studium vlivu XtiSC na počty makrofágů u experimentálních skupin pulců <i>X. tropicalis</i>	31
6.2.	Studium ovlivnění migračního potenciálu XtiSC makrofágy	39
6.3.	Studium míry regenerace u experimentálních skupin pulců <i>X. tropicalis</i> po amputaci ocasu.....	48
6.4.	Studium vlivu makrofágů a XtiSC na počty satelitních buněk po amputaci ocasu u pulců <i>X. tropicalis</i>	49
6.5.	Vytvoření vektoru exprimujícího EGFP pod Pax7 promotorem pro <i>in vivo</i> vizualizaci satelitních buněk	54
7.	Diskuze.....	58
8.	Závěr	64
9.	Seznam literárních zdrojů.....	65

1. Úvod

Svalová regenerace je již po mnoho let studovaným tématem mnoha výzkumných týmů. I přes obsáhlé množství informací, které bylo o tomto fyziologickém procesu získáno je stále, pro lepší pochopení mechanismů, potřeba podrobnějšího výzkumu, který odhalí molekulární podstatu a klíčové buněčné interakce odehrávající se v jejím průběhu. Tyto poznatky mohou být následně využity v léčbě svalově degenerativních onemocnění či po poranění svalové tkáně.

V prvotní fázi regenerace dochází k vytvoření zánětlivého prostředí, které je nezbytné pro apoptózu buněk a správné přeskupení tkáně. U žab rodu *Xenopus* toto zánětlivé prostředí zajišťují myeloidní buňky (makrofágy typu M1), které mimo jiné aktivují proliferaci satelitních buněk. V následujících fázích převládá přítomnost regenerativních M2 makrofágů, jejichž role spočívá především ve správném uskupení extracelulární matrix a diferenciaci satelitních buněk do myoblastů a svalových vláken.

Je obecně známo, že prodloužení zánětlivé fáze vede k nadměrnému hromadění kolagenu a vzniku jizvy. Z tohoto důvodu se jako slibným nástrojem pro podporu regenerace nabízejí MSC vykazující imunomodulační potenciál. Mezi další příhodné vlastnosti MSC patří jejich schopnost aktivovat proliferaci satelitních buněk a absence MHC-II glykoproteinu na jejich povrchu, díky čemuž nevyvolávají alogenní reakci imunitního systému.

V laboratoři školitele byla ustanovena buněčná kultura z progenitorů Sertoliho buněk a peritubulárních myoidních buněk zvaná XtiSC, která vykazuje mnohé podobné vlastnosti jako MSC. Má například podobné povrchové markery, je schopná epiteliální-mesenchymální transice, diferenciaci v chondrocyty, osteocyty a adipocyty a dokáže migrovat k místu poranění.

Vhodným experimentálním organismem pro studium regenerace jsou žáby rodu *Xenopus*, které se vyznačují průhlednými embryi a experimentálně přístupnými časnými stádii. Žáby rodu *Xenopus* jsou v larválním stádiu a ve stádiu pulce schopny úplné regenerace čočky a ocasu. Oproti jiným obojživelníkům se u nich nevyskytuje aktivní dediferenciaci buněk a je u nich přítomna Pax7+ populace satelitních buněk. Díky těmto vlastnostem jsou poznatky získané na jejich modelu snadno využitelné i pro výzkum v lidské medicíně.

V této diplomové práci se zaměřuji především na objasnění imunomodulačního potenciálu XtiSC po depleci buněk myeloidní řady u pulců *Xenopus tropicalis* a jejich vlivu na proliferaci a diferenciaci Pax7⁺ satelitních buněk po amputaci ocasu. V této souvislosti jsem taktéž sledovala produkci oxidu dusnatého transplantovanými XtiSC, který představuje důležitou signální molekulu z pohledu imunomodulace a procesu regenerace.

2. Literární přehled

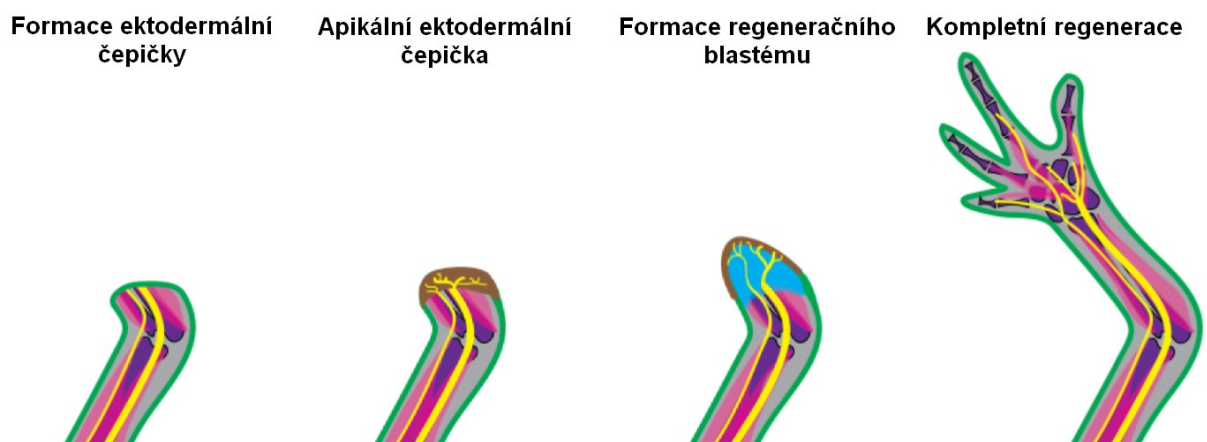
2.1. Regenerace

Regenerace je fyziologický proces, kterým organismy nahrazují poškozené tkáně. Obrovská regenerační schopnost je známá například u rostlin, jejichž buňky jsou i v diferencovaném stádiu totipotentní a je u nich tedy teoreticky možná obnova celého organismu z jediné buňky (Haberlandt a Akad, 1902). Rozsah a samotný způsob regenerace se v živočišné říši velmi liší a je oproti rostlinné říši omezenější. Přesto je regenerace nezbytným procesem pro správný průběh života. Pro to, abychom získali více poznatků pro potenciální využití v lidské regenerativní medicíně je zapotřebí nadále odhalovat přesné mechanismy, které regeneraci řídí. Obecně existují 3 druhy regenerace, a to epimorfóza, morfolaxe a kompenzační regenerace, které v následujících kapitolách krátce popíši.

2.2. Druhy regenerace

2.2.1. Epimorfóza

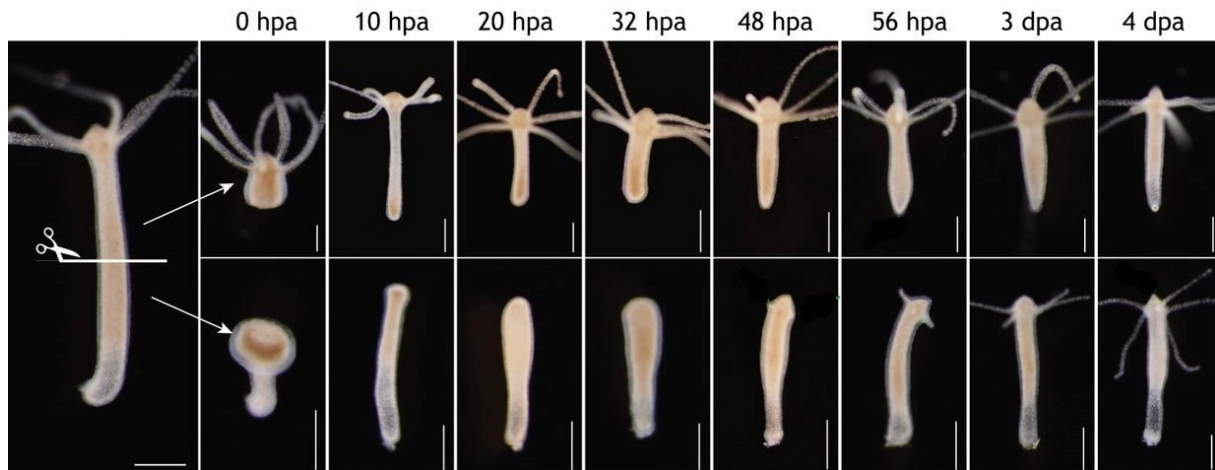
Učebnicovým zástupcem epimorfického způsobu regenerace je mlok, u kterého je možná úplná obnova chybějící končetiny, a to se správnou pozicí a funkcí nově vzniklých tkání. Při amputaci končetiny u něj do 6-12 hodin dochází k obalení rány buňkami epitelu a vytvoření tzv. ektodermální čepičky (Gilbert, 2000). Ta je jednovrstevná a její následnou proliferací vzniká apikální ektodermální čepička. Vrstvy buněk pod čepičkou dediferencují a proliferují. V tomto stádiu se tato skupina buněk nazývá regeneračním blastémem. Jeho buňky ke konci regenerace diferencují do příslušných buněčných typů a tvoří nově vzniklou končetinu.



Obrázek 1: Epimorfická regenerace končetiny (upraveno dle Vieira a McCusker, 2018).

2.2.2. Morfalaxe

Proces morfalaxe studoval v 18. století švýcarský vědec Abraham Trembley na modelu nezmara (*Hydra*), jeho název ovšem pochází až od Thomase Hunta Morgana. Při rozříznutí těla nezmara na dvě části dojde ke vzniku dvou menších nezmarů, aniž by docházelo k proliferaci buněk. Buňky se při tomto ději orientují díky poziční informaci, pro kterou je nezbytný správný gradient morfogenů.



Obrázek 2: Morfalaxe u nezmara. hpa – hodiny po amputaci, dpa – dny po amputaci; měřítko ukazuje 500 μm (upraveno dle Vogg a kol., 2019).

2.2.3. Kompenzační regenerace

Typickým příkladem kompenzační regenerace je regenerace jater u člověka. Byla zmíněna již v řecké mytologii, kde Prometheova játra dorůstala každý den po útoku orla. V jaterních buňkách dochází po poškození tkáně k produkci cytokinů (IL-6) a růstových faktorů (EGF, HGF), které svým působením zahájí expresi více než 100 genů podporujících replikaci DNA a vstup buňky do buněčného cyklu (Li a kol., 2001; Nejak-Bowen a kol., 2013). Dochází tedy k obnově tkáně pomocí opětovného vstoupení zbývajících buněk do buněčného cyklu, které dají vznik buňkám stejného typu jako ony samotné. Netvoří se zde regenerační blastém, ani nedochází k dediferenciaci.

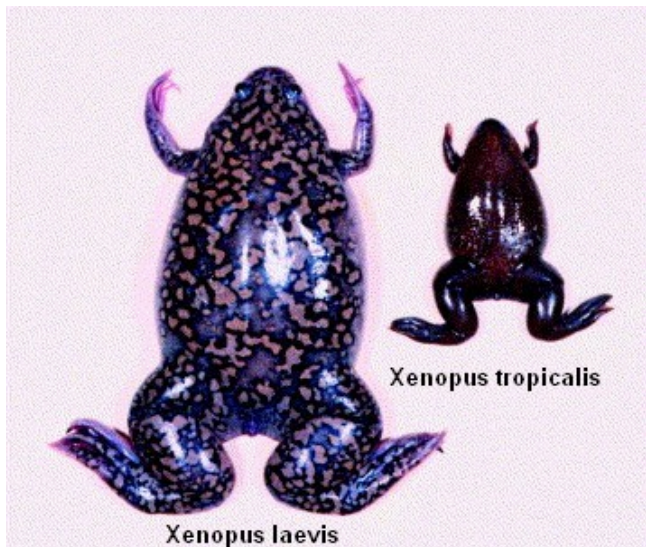
2.3. *Xenopus tropicalis* a *Xenopus laevis*

Třída obojživelníků zahrnuje mnohé modelové organismy vhodné pro embryologický výzkum. Je tomu tak především díky jejich velkým embryím vyvíjejícím se mimo tělo matky. Tyto charakteristiky mají také embrya ryb, třída obojživelníků je ovšem pro studium mnohem příznivější jelikož u ní nedošlo k celogenomové duplikaci jako u kostnatých ryb a je u ní tedy

umožněna lepší genetická analýza pozorovaných fenotypů (Grainger, 2012; De La Serrana a kol., 2014). Pro studium regenerace jsou ideální žáby rodu *Xenopus*, pocházející z řek a deštných pralesů západní Afriky. Jsou to *Xenopus laevis* (Drápatka vodní) a námi používaný *Xenopus tropicalis* (Drápatka tropická). *X. laevis* byly dříve hojně využívány k těhotenským testům u žen. Moč

ženy byla injikována do lymfatického vaku na dorzální straně těla d žáby a pokud moč obsahovala pro těhotenství typický hormon

choriový gonadotropin, začala žába klást vajíčka (Shapiro a Zwarenstein, 1934). Genomy drápkatých žab rodu *Xenopus* byly plně osekvenovány a vykazují až 1700 ortologů ke genům, jejichž mutace jsou spojené s manifestací lidských onemocnění (Hellsten a kol., 2010). Genom *X. laevis* je ovšem pseudo-tetraploidní, což je pro lidský výzkum nevýhodou (Amaya a kol., 1998). Námi využívaný *X. tropicalis* má oproti jejímu příbuznému *X.laevis* menší diploidní genom. *X. laevis* se vyznačuje generační dobou přibližně 1-2 roku a délkou dospělého 10 cm zatímco *X. tropicalis* má generační dobu 4-6 měsíců a v dospělosti měří 5-6 cm, díky čemuž je méně náročný na chov (Hellsten a kol., 2010b).

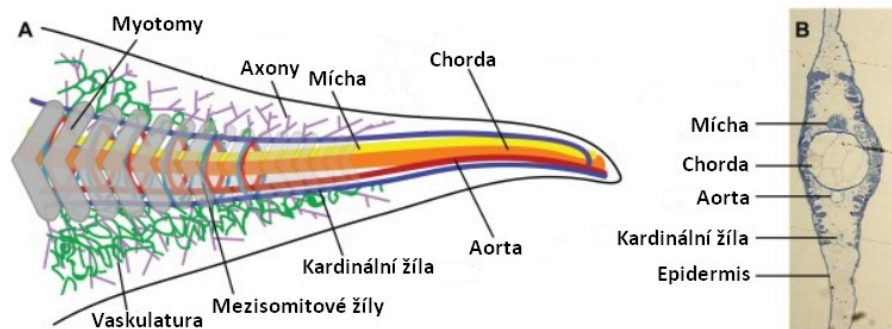


Obrázek 3: Dospělci *X. laevis* a *X. tropicalis* (upraveno dle Amaya a kol., 1998).

2.4. Regenerace u žab rodu *Xenopus*

Z třídy obojživelníků jsou jedinci z řádu ocasatých schopni regenerace po celý svůj život, ovšem jedinci z řádu žab mají schopnost regenerovat pouze do stádia metamorfózy. Již po mnoho let je pro studium regenerace z rodu *Xenopus* hojně využívána obzvláště *X. laevis*, a v menší míře její příbuzný *X. tropicalis*. U rodu *Xenopus* dochází v larválním stádiu a ve stádiu pulce v průběhu 2 týdnů k úplné regeneraci čochy a ocasu, který obsahuje chordu, míchu, žíly, tepny, svalstvo v podobě myotomů a povrchovou epidermis. Na rozdíl od hojení ran u savců

je hojení u pulců *Xenopus* bezjizvé. S vyššími vývojovými stádii ovšem tato regenerace ustupuje a převažuje hojení pomocí jizev. V přechodu mezi



Obrázek 4: Stavba ocasu (A): Podélný řez (B) Příčný řez (upraveno dle Love a kol., 2011).

významnou roli především změny v adaptivní imunitě (Mescher a kol., 2017).

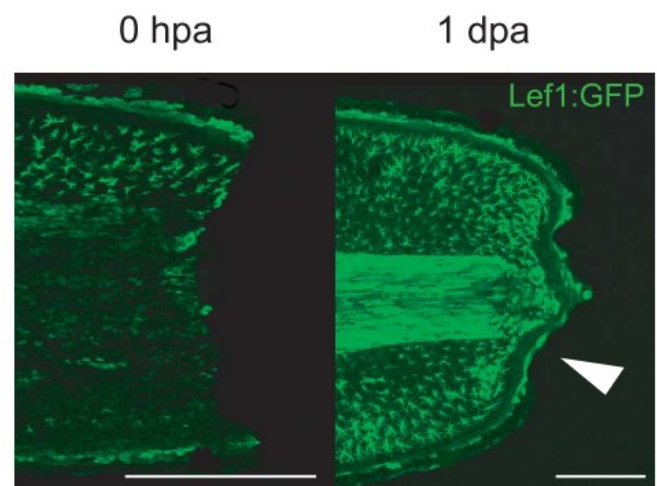
U *X. laevis*, ne však u *X. tropicalis* se ve stádiu 45-47 vyskytuje tzv. refraktní fáze, ve které nejsou pulci schopni regenerace po poškození tkáně (Beck a kol., 2003). Přesný důvod, proč se refraktní fáze u pulců nachází zatím není znám. Ve stejném čase ovšem u pulce dochází ke změně příjmu živin z maternálního žloutku na potravu z okolí. Také u něj během refraktní fáze dochází k maturaci imunitního systému, včetně rozvoje adaptivní imunity. Důkaz propojení refraktní fáze a rozvoje imunitního systému byl potvrzen ve studii, kdy po podání imunopresiv refraktní fáze u pulce neproběhla (Fukazawa a kol., 2009).

V průběhu regenerace dochází k rozdílné genové expresi. Během celé regenerace dochází k postupnému nárůstu v expresi enzymů, jejichž funkce ústí v produkci tzv. ROS (reactive oxygen species). Patří k nim například NAD kináza a glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (Love a kol., 2011, 2013). ROS jsou důležitým komponentem regenerace u pulců a při zablokování jejich produkce dochází k zastavení buněčné proliferace a regenerace nepostupuje. Vysoké hladiny ROS jsou potřebné pro správnou funkci Wnt/ β signální dráhy a následné aktivaci fgf20. ROS jsou také chemoatraktanty a atrahují zánětlivé buňky do místa zranění (Love a kol., 2013). Při porovnání genové exprese u regenerativních pulců a dospělců

po metamorfóze se zjistilo, že u regenerativních pulců dochází k rychlejším změnám v expresi transkriptů souvisejících s metabolismem, buněčným cyklem, vývojem a zánětlivou odpovědí (Lee-Liu a kol., 2014).

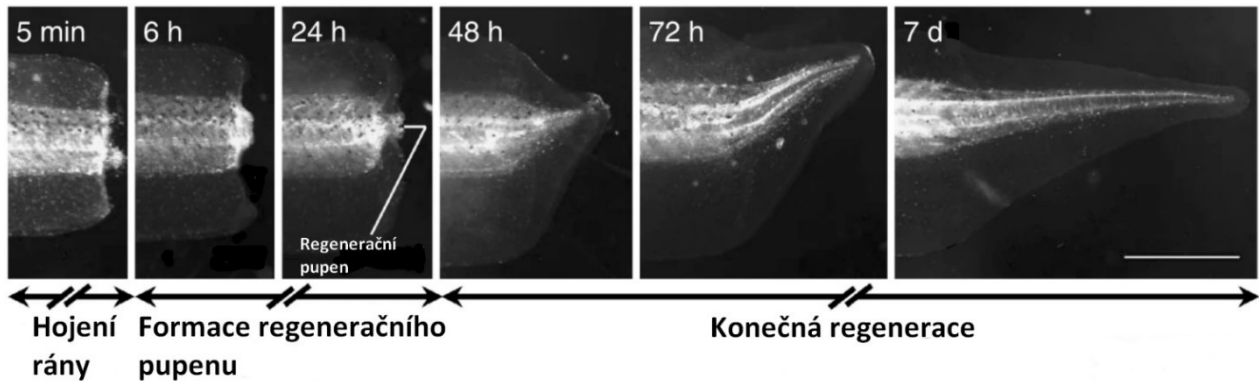
Po amputaci ocasu dochází během 24 hodin k zánětlivé reakci, produkci ROS v amputované oblasti a povrchovému hojení tkáně. Cca 6 hodin po zranění je v již existujících buňkách tkáně zvýšena produkce V-ATPáz, což vede k repolarizaci tkáně během jednoho dne. Tento proces je důležitý pro aktivaci regenerace, nemá však přímý vliv na hojení rány či vývoj ocasu (Adams a kol., 2007). Při narušení kapilár dochází v místě poranění k hromadění krevních destiček a spuštění zánětlivé reakce. V amputované oblasti se vytváří signální centrum, ve kterém jsou pomocí imunitního systému vylučovány proteázy (př. kolagenázy, gelatinázy a stromelysiny [Santosh a kol., 2011]) nezbytné pro regenerační proces, růstové faktory a cytokiny. K signálnímu centru jsou atrahovány monocyty, které zvyšují populaci makrofágů. Makrofágy zde slouží především k odstranění mrtvých buněk a fibrinu, což napomáhá k remodelaci tkáně (Singer a Clark, 1999).

V místě poranění jsou nezbytným faktorem pro regeneraci také nově objevené regeneration-organizing cells (ROC). ROC jsou během normálního vývoje přítomny v epidermis a při poranění se díky signalizaci myeloidních buněk, ROS a TGF- β přesunují do místa amputace. Zde ROC produkují ligandy (FGF, BMP, WNT, NOTCH a TGF- β), které se navazují na své receptory přítomné na progenitorových buňkách a tím spouští jejich proliferaci (Aztekin a kol., 2019).



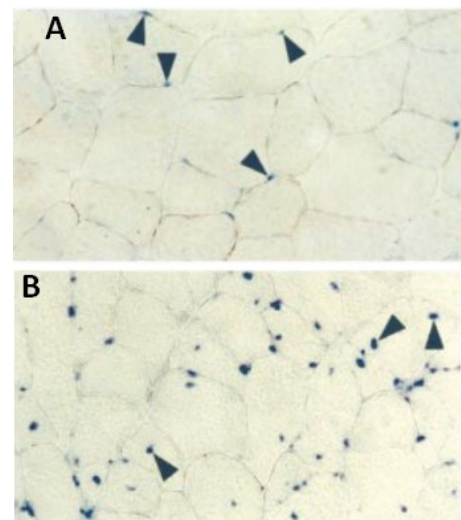
Obrázek 5: Přesun ROC do místa amputace ocasu. ROC jsou zobrazeny pomocí jejich markeru Lef1, vázaného GFP proteinem; hpa – hodiny po amputaci, dpa – dny po amputaci; šipka míří na ROC umístěné podél epidermis; měřítko ukazuje 250 μm (upraveno dle Aztekin a kol., 2019).

24 hodin po amputaci dochází u pulce k migraci progenitorových buněk do tzv. regeneračního pupenu, kde buňky dále intenzivně proliferují, následně diferencují a zajišťují téměř perfektní obnovu chybějících tkání (Beck a kol., 2003). Od regeneračního blastému se tento typ regenerace odlišuje především absencí aktivní dediferenciace buněk, díky čemuž je rod *Xenopus* vhodnějším modelovým organismem k uplatnění v medicíně než jiní obratlovci.



Obrázek 6: Fáze regenerace ocasu. Měřítko ukazuje 1 mm (upraveno dle Ferreira a kol., 2018).

Při obnově svalstva se jak u žab, tak i plazů, ptáků a savců uplatňují satelitní buňky, které jsou specifické svou expresí proteinu Pax7. Vyskytují se vmezeřené mezi svalovými vlákny, obklopené bazální laminou. Jsou mitoticky potlačené a aktivují se při odpovědi na poranění, čímž je zahájeno jejich znovu vstoupení do buněčného cyklu. Při jejich aktivaci satelitní buňky produkují prozánětlivé cytokiny, které slouží jako chemoatraktanty makrofágů a monocytů a způsobují jejich migraci do místa poranění (Kimczak, 2018). Po proliferaci satelitních buněk nastává jejich diferenciaci v progenitory myogenní linie, které následně fúzí s již existujícími svalovými vlákny, či vytváří úplně nová (Schultz a kol., 1985; Seale a kol., 2000). Počet satelitních buněk zůstává v klidovém stavu po celý život přibližně konstantní, což je zajištěno jejich neustálou sebeobnovou (Gibson a Schultz, 1983). Jedním ze známých vnějších stimulů, který aktivuje satelitní buňky, je oxid dusnatý (NO), který je uvolňován při mechanickém poranění tkáně a způsobuje jejich hypertrofii a sníženou adhezi k bazální lamině (Busse a Fleming,



Obrázek 7: Satelitní buňky mezi svalovými vlákny vyznačené díky in-situ hybridizaci Pax-7 mRNA (A): Svalstvo k klidovému stavu (B): Regenerující svalstvo (upraveno dle Seale a kol., 2000).

1998). NO se dále uplatňuje v obnově vaskulárního systému a v zánětlivých procesech, při čemž jeho hlavním producentem jsou makrofágy (Schaffer a kol., 1996).

2.5. Kmenové buňky

V procesu obnovy tkání živočichů hrají významnou roli buňky kmenové, které jsou charakterizované možností diferencovat v jiný buněčný typ a neomezenou sebeobnovou. Podle schopnosti diferenciace se kmenové buňky dělí na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. Totipotentní kmenové buňky jsou charakterizovány schopností diferencovat v jakoukoliv buňku organismu. Příkladem totipotentní buňky je zygota, ze které vznikají buňky všech tří zárodečných listů a extraembryonální tkáně. Pluripotentní buňky se vyznačují diferenciací v tkáně všech tří zárodečných listů kromě trofoblastu. Jsou to například embryonální kmenové buňky (Evans a Kaufman, 1981). Multipotentní kmenové buňky diferencují do různých buněčných typů se specifickou funkcí (Pittenger a kol., 1999). Příkladem jsou mezenchymální kmenové buňky (MSC) či hematopoetické kmenové buňky (HSC). Posledním typem jsou unipotentní kmenové buňky, které jsou schopné diferenciace do pouze jediného buněčného typu. Známým příkladem této skupiny jsou spermatogoniální kmenové buňky.

2.6. Mezenchymální kmenové buňky (MSC)

Při regeneraci kosterního svalstva se společně se satelitními buňkami na obnově tkáně mimo jiné významně podílejí také mezenchymální kmenové buňky (MSC). Jedná se o multipotentní kmenové buňky, schopné diferencovat do několika buněčných linií mezodermálního původu, a to do adipocytů, chondrocytů, osteocytů a kardiomyocytů (Caplan 1991; Vellasamy a kol., 2012). Při stimulaci specifickými faktory jsou ovšem ochotné diferencovat také v buňky nervové, epiteliální či hepatocyty (Lu a kol., 2004; Snykers a kol., 2011). MSC jsou producenty mnoha růstových faktorů a cytokinů, mezi které patří například HGF, IGF-1, EGF, NGF, TGF- α a VEGF (Rhee, 2015). Produkují i pro regeneraci klíčový oxid dusnatý, který mimo jiné aktivuje satelitní buňky a má imunosupresivní účinky (Ren a kol., 2008). Po poranění tkáně jsou MSC schopné migrovat do místa poranění a produkovat zde solubilní protizánětlivé faktory, které působí inhibičně na imunitní systém (Djouad a kol., 2003). Jedním z hlavních důvodů, proč jsou MSC hojně studovány a využívány v regenerativní medicíně je absence MHC-II glykoproteinu na jejich povrchu, díky čemuž nevyvolávají alogenní reakci zprostředkovanou T efektorovými buňkami (Ryan et al. 2005). MSC tedy podporují

regeneraci především produkcí protizánětlivých faktorů a aktivací satelitních buněk, které následně diferencují v nová svalová vlákna. Pro jejich slibné vlastnosti jsou předmětem studií mnoha institucí. Abychom ovšem mohli úspěšně plně využít jejich potenciál, je potřeba dalších studií, především ke zjištění jejich vztahu k dalším progenitorovým buňkám a imunitnímu systému.

2.7. Sertoliho buňky

Sertoliho buňky se nacházejí v semenotvorných kanálcích varlat a jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze. Jedná se o velké somatické buňky přisedající k bazální membráně ohraničené peritubulárními myoidními buňkami, které zajišťují především strukturní integritu kanálků (Maekawa a kol., 1996). Sertoliho buňky jsou mezi sebou spojeny těsnými spoji a buněčnými spoji zprostředkovávajícími jejich neustálý kontakt a vytvoření hemato-testikulární bariéry. Tato bariéra rozděluje semenotvorný kanálek na bazální a adluminální stranu a je nezbytná pro vytvoření správných podmínek pro spermatogenezi (Mruk a Cheng, 2015). Na bazální straně kanálku jsou zárodečné buňky v kontaktu s krevním oběhem a lymfatickým systémem, zatímco adluminální strana, ve které dochází k pozdějším stádiím spermatogeneze, je od těchto oběhů oddělena. Toto prostředí, které je hemato-testikulární bariérou vytvářeno, je navíc imunologicky privilegované (Li a kol., 2012).

Mezi neopomenutelnou roli Sertoliho buněk ve spermatogenezi patří sekrece nezbytných molekul modulujících pomocí zpětných vazeb proces spermatogeneze, a to androgen-vázající protein (ABP), aktivin a inhibin B. Sertoliho buňky také sekretují potřebné živiny, enzymy a ionty, které stimulují a vyživují vyvíjející se spermie. Plní také roli fagocytickou, která je nutná pro odstranění poškozených buněk a přebytečné cytoplazmy spermatid během jejich transformace ve spermie (Nakanishi a Shiratsuchi, 2004).

2.8. Progenitory Sertoliho a myoidních buněk – XtiSC

Z varlat juvenilního samce *X. tropicalis* byla v laboratoři školitele založena buněčná kultura progenitorů Sertoliho buněk a peritubulárních myoidních buněk - XtiSC. Při prozkoumání genové exprese této kultury, bylo zjištěno, že vykazuje markery MSC (*cd29*, *cd44* a *cd90*) a některé markery pluripotence (*klf4* a *myc*). Ovšem exprese markerů zárodečných buněk (*dazl*, *ddx4* a *ddx25*) u nich nebyla přítomna, z čehož byl vyvozen závěr, že jde o buňky somatické (Tlapáková a kol., 2016). Při zjišťování jejich přesného původu byla kultura testována na markery Sertoliho buněk, peritubulárních myoidních buněk a Leydigových buněk. Pozitivní výsledky se ukázaly na markery Sertoliho buněk (*Sox9*, *vimentin*, *cytokeratin*

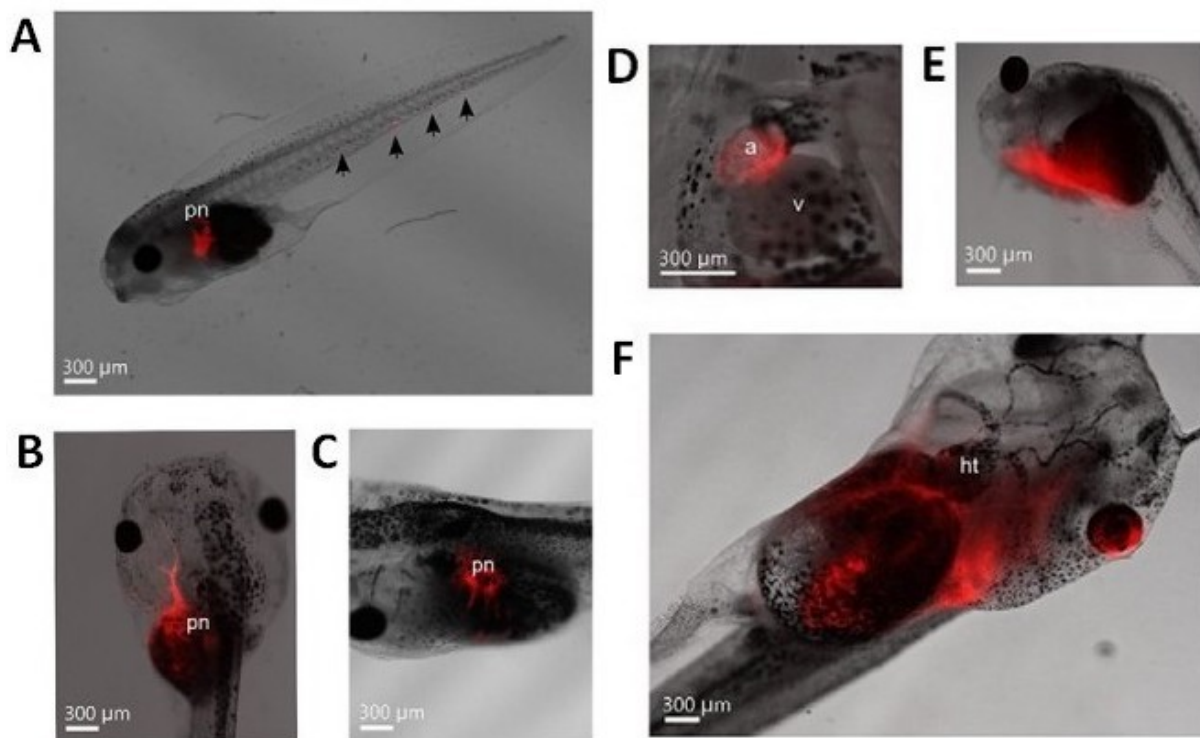
Zkratka genu	Jméno genu	Transkript	Genová exprese				
			testes	XiTSC	KiTSCc	XiTSC-RFP	XiTSCc-RFP
Markery pluripotentních buněk							
<i>klf4</i>	Kruppel-like factor 4	ENSXETT00000012646					
<i>myc</i>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	ENSXETT00000054171					
<i>pou5f3.1</i>	POU class 5 homeobox 3, gene 1	NM_001285474					
<i>pou5f3.2</i>	POU class 5 homeobox 3, gene 2	NM_001129934					
<i>pou5f3.3</i>	POU class 5 homeobox 3, gene 3	NM_001130364					
<i>sox2</i>	SRY (sex determining region Y) - box 2	ENSXETT00000004031					
<i>tert</i>	telomerase reverse transcriptase	ENSXETT000000034113					
Markery zárodečných buněk							
<i>dazl</i>	deleted in azoospermia-like	NM_203748					
<i>ddx4</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	ENSXETT000000066339					
<i>ddx25</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 25	ENSXETT000000064463					
Markery MSC							
<i>itgb1</i>	integrin, beta 1 (antigen CD29 includes MDF2)	ENSXETT000000048743					
<i>cd44</i>	CD44 molecule (Indian blood group)	ENSXETT000000016456					
<i>thy1</i>	Thy-1 cell surface antigen	ENSXETT000000046686					
Markery spojené s varlaty							
<i>acta2</i>	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ENSXETT000000020391					
<i>cyp11a1</i>	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	ENSXETT000000011263					
<i>cyp17a1</i>	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	ENSXETT000000033323					
<i>kitlg</i>	KIT ligand ~ Stem Cell Factor	NM_001045596					
<i>lif</i>	leukemia inhibitory factor	ENSXETT000000053337					
<i>sox9</i>	SRY (sex determining region Y) - box 9	ENSXETT000000048344					
<i>vim</i>	vimentin	ENSXETT000000016267					
Kontrolní gen							
<i>odc1</i>	ornithine decarboxylase 1	ENSXETT000000007603					

Obrázek 8: RT-PCR expresní analýza buněčné kultury založené z varlat *X. tropicalis* (Tlapáková a kol., 2016).

a *β -katenin*) a peritubulárních myoidních buněk (*Sma* a *lif*). Tyto poznatky poukazovaly na existenci společného progenitoru Sertoliho a peritubulárních myoidních buněk s charakteristikami MSC.

Pro studium migračního potenciálu XtiSC byla vytvořena transgenní buněčná kultura exprimující Katushka RFP pod CAG promotorem (XtTSCc-RFP). Buňky byly poté injikovány do peritoneálního prostoru pulců ve stádiu 41. V průběhu jednoho týdne byly buňky lokalizovány v srdci, pronefros a střevě, což jsou zároveň hlavní místa migrace MSC po injekci do krevního oběhu (Cornelissen a kol., 2015). Migrační potenciál XtiSC byl dále studován v předešlé diplomové práci (Wróblová, 2020) v laboratoři školitele. V této práci byly buňky mikroinjikovány do dorzální žíly u kořene ocasu pulce ve stádiu 47-50. Následně byla pulcům amputována 1/3 ocasu a pod fluorescenčním stereomikroskopem byl pozorován migrační potenciál XtiSC po dobu 1 týdnu. Migrace XtiSC směrem do místa amputace byla prokázána až u 65 % pulců.

XtiSC jsou po indukci GSK-3 inhibitoru CHIR99021 schopné epiteliální-mesenchymální transice. Takto ošetřené buňky vykazovaly podobné vlastnosti jako MSC, a to zejména schopnost diferenciaci v chondrocyty, osteocyty, adipocyty a migraci k rakovinným buňkám *in vitro* a k místu poranění *in vivo* (Nguyen a kol., 2019).



Obrázek 9: Mikroinjekce XtiSC do peritonea *X. tropicalis* (A): Akumulace XtiSC v pronefros 1 den po mikroinjekci (B,C): Akumulace XtiSC v pronefros 13 dní po mikroinjekci (D): Migrace XtiSC do srdeční komory 15 dní po mikroinjekci (E,F): Rostoucí buněčná síť v těle pulce po 30 dnech mikroinjekce XtiSC (Tlapáková a kol., 2016).

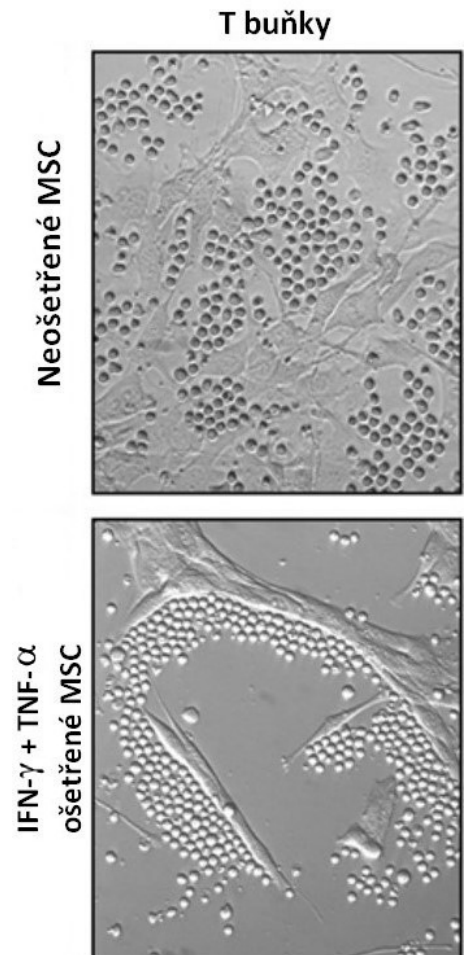
2.9. Role imunitního systému v regeneraci

Schopnost obratlovců regenerovat amputované končetiny je z velké části zprostředkována buňkami vrozeného imunitního systému, které ovlivňují schopnost regenerace ještě před vytvořením regeneračního blastému. Po vytvoření regeneračního blastému se na regeneraci podílejí makrofágy, které zajišťují růst blastému a následný správný vývoj končetiny (Mescher a kol., 2017). Pozitivní efekt na regeneraci byl u myeloidní linie prokázán remodelací extracelulární matrix, indukci vaskularizace a iniciací apoptotických procesů (Koh a DiPietro, 2011). Do místa poranění jsou buňky myeloidní linie přitahovány díky jeho mikroprostředí, které je hypoxické a je zde vysoká koncentraci ROS (Ferreira a kol., 2018).

Při amputaci končetiny jsou první dva dny v místě poranění přítomné tzv. M1 makrofágy (CD68+/CD163-), nazývané také jako zánětlivé, které zde svým působením indukují proliferaci satelitních buněk a způsobují destrukci svalové tkáně sekrecí zánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Tyto zánětlivé cytokiny zvyšují míru apoptotických procesů, což umožňuje přeskupení tkáně a relokaci ROC do místa amputace (Aztekin a kol., 2020). V dalších fázích regenerace dosahují maxima M2 makrofágy (CD68-/CD163+), též nazývané jako regenerativní. Ty podněcují diferenciaci satelitních buněk ve svalová vlákna a zajišťují remodelaci tkáně sekrecí protizánětlivých cytokinů (IL-10, IL-13) (Schneider a Tidball, 1994; Ren a kol., 2008).

Ve změně exprese mezi M1 a M2 makrofágy hrají významnou roli MSC a extracelulární matrix, které svým působením potlačují expresi M1 makrofágů, a naopak vytvářejí prostředí vhodné pro expresi regenerativních M2 makrofágů (Ren a kol., 2008). Obecně je platné, že regenerace schopní živočichové dokáží mnohem efektivněji potlačit zánětlivé procesy než zvířecí druhy s méně účinnými regeneračními schopnostmi. Delší působení zánětlivých procesů vyúsťuje ve špatné přeskupení extracelulární matrix, což zapříčiňuje hromadění kolagenu a tím vznik jizvy (Godwin, 2014).

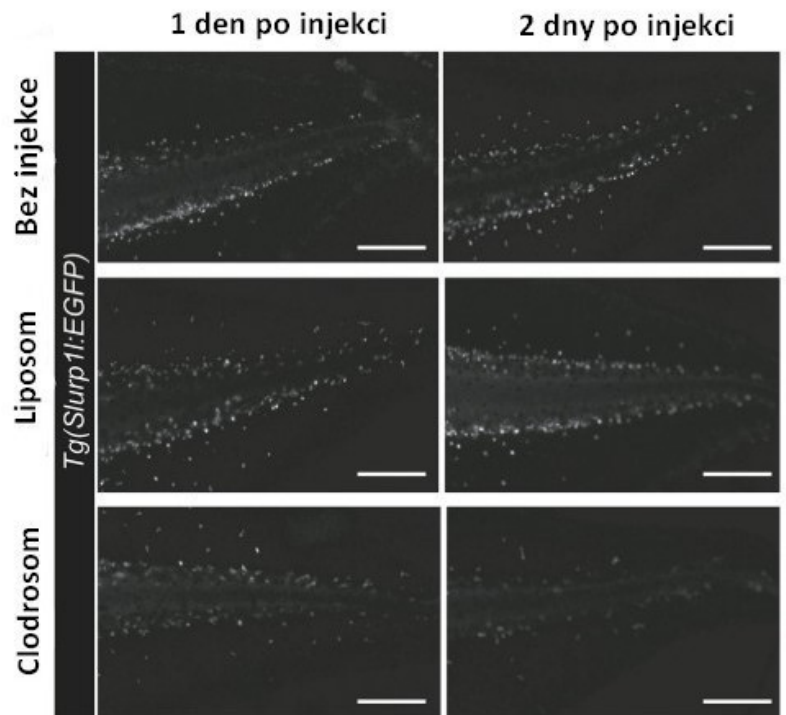
MSC mají mimo schopnost aktivovat regenerativní M2 makrofágy také svou vlastní protizánětlivou funkci, kdy se v reakci na zánětlivé cytokiny (IFN- γ , TNF- α , IL- α , IL- β) aktivují a zahajují produkci několika chemokinů a iNOS (inducibilní formy NO syntázy). iNOS je producentem NO, což společně s chemokiny atrahuje T a B buňky do blízkosti MSC, což má díky vysoké koncentraci NO za následek potlačení funkce T a B lymfocytů a jejich proliferace (viz obrázek č.10) (Ren a kol., 2008).



Obrázek 10: Migrace T buněk k MSC po aktivaci MSC zánětlivými cytokiny vedoucí k potlačení funkce T buněk (upraveno dle Ren a kol., 2008).

Pro zjištění, zda jsou makrofágy důležitým faktorem v procesu regenerace provedli Aztekin a kol. (2020) jejich depleci pomocí mikroinjekce klodronátu-obsahujících liposomů (klodrosomů) do krevního oběhu pulce. Tento přístup je založen na internalizaci liposomů, které obsahují malé hydrofilní molekuly klodronátu pouze do makrofágů, kde dojde k jeho akumulaci. Uvnitř makrofágů je tento komplex rozložen fosfolipázami a po překročení jisté hranice klodronátu dochází k jejich apoptóze. Vzhledem k tomu, že liposomy a ani klodronát nejsou toxické pro ostatní nefagocytující

buňky, jsou klodrosomy vhodným prostředkem pro specifickou depleci makrofágů v různých tkáních (Rooijen a Hendrikx, 2010). Aztekin a kol. (2020) mikroinjikovali tento komplex do ventrální žíly pulců a po amputaci ocasů pozorovali jejich regenerační schopnost a počet makrofágů. Pulci s mikroinjikovanými klodrosomy vykazovali menší počet makrofágů a horší regeneraci než pulci s injikovaným prázdnými liposomy, který sloužil jako negativní kontrola, což poukazuje na významnou roli makrofágů v procesu regenerace ocasu.



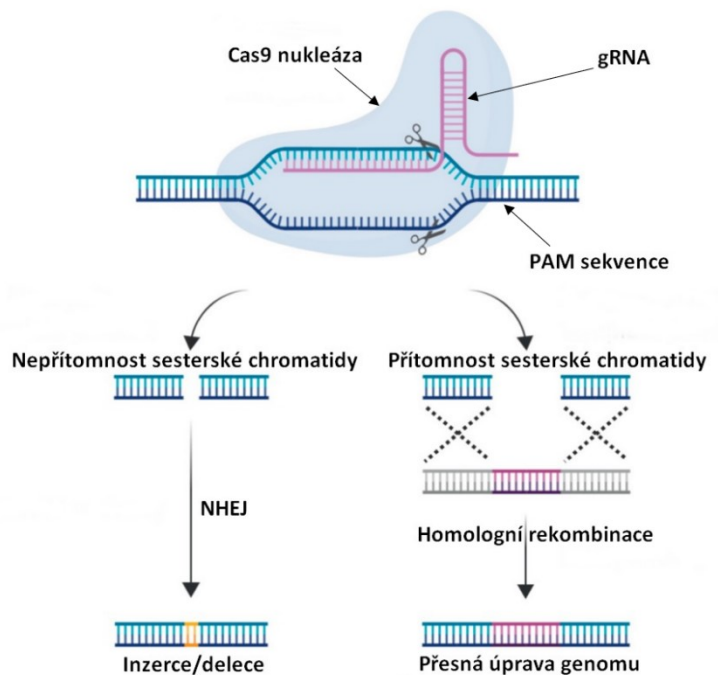
Obrázek 11: Mikroinjekce klodrosomů pro depleci makrofágů do pulců. Obrázek znázorňuje počty makrofágů v ocasu pulců pomocí EGFP transgenní linie (upraveno dle Aztekin a kol., 2020).

2.10. CRISPR-Cas9

Již od 70. let 20. století pátrají vědci po vhodné metodě genetického inženýrství, která by napomohla rychlému a přesnému editování DNA. Mezi vhodné kandidáty v minulosti patřily například Sce-I endonukleázy ze *Saccharomyces cerevisiae* (Choulika a kol., 1995), Zinc-finger nukleázy založené na eukaryotických transkripčních faktorech (Urnov a kol., 2005) či Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) z bakterií *Xanthomonas* (Moscou a Bogdanove, 2009). Všechny tyto metody jsou založeny na specifické vazbě proteinů na DNA a vytvoření dvojláknového zlomu, který je následně opraven buď homologní či nehomologní rekombinací. Mezi nejnovější nástroj využívaným k insercím, delecím či nahrazením DNA za jinou patří nyní nejvíce využívaný Clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR-Cas9) systém. Popularitě jeho využívání napomohla především rychlost navrhování jeho komponent, velká účinnost a relativně nízká cena.

CRISPR-Cas9 systém je odvozen z adaptivního imunitního mechanismu bakterií proti virovým infekcím a skládá se z takzvané CRISPR RNA (crRNA) a Cas proteinu s nukleázovou aktivitou. Po infekci bakterie cizorodou DNA dochází k adaptivnímu uložení sekvence této DNA do bakteriálního genomu, tzv. spaceru. Ty jsou od sebe odděleny krátkými DNA repeticemi a při infekci bakterie dochází k jejich transkripci a vytvoření pre-crRNA, která je následně rozštěpena na několik cr-RNA. Na tuto cr-RNA se připojuje Cas nukleáza a tento komplex se díky komplementaritě bazí 18-20 nukleotidů navazuje na cizorodou DNA. Na cizorodé DNA jsou poté vytvořeny dvojláknové zlomy. K vytvoření zlomů v DNA dojde ovšem pouze tehdy, následuje-li za místem štěpení 2 – 5 párů bazí dlouhá specifická sekvence, takzvaný PAM motiv. Tyto motivy se nevyskytují v blízkosti spacerů, aby bylo zabráněno nechtěnému štěpení hostitelského genomu (Westra a kol., 2013). Po vytvoření ds zlomů dochází v DNA k její opravě. Častějším mechanismem opravy je NHEJ (non-homologous end joining), který k opravě nepotřebuje homologní templát a probíhá tedy ve

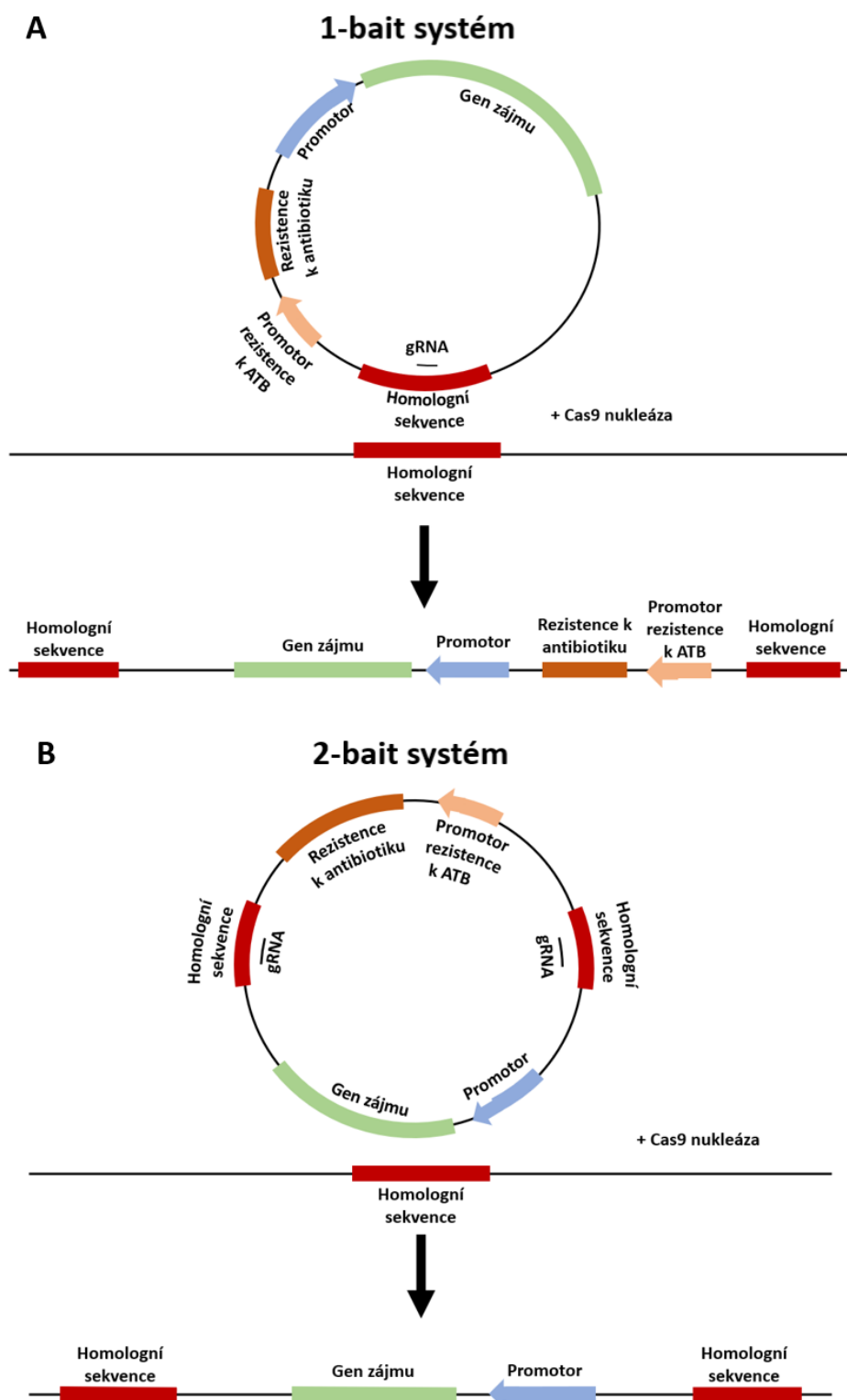
všech fázích buněčného cyklu. Tento mechanismus opravy spočívá ve spojení tupých konců DNA pomocí ligáz, což má často za následek inserce či delece a je proto využívám ke genetickým knock-outům (Heidenreich a kol., 2003). Pro genetický knock-in je ovšem zapotřebí, aby byla DNA opravena pomocí homologní rekombinace, která probíhá pouze za přítomnosti sesterské chromatidy v S, G2 a M fázi, kdy je DNA již zreplikována (Saleh-Gohari a Helleday, 2004).



Obrázek 12: Mechanismy opravy DNA po vytvoření ds zlomu Cas9 nukleázou (upraveno dle van Kampen, 2019).

CRISPR-Cas9 je nyní klíčovým nástrojem využívaným ve vědecké sféře k úpravě genetické informace. Ke specifickému štěpení cílové sekvence je potřeba pouze konstrukce komplementární gRNA (guide RNA) navazující se na cílovou DNA a Cas nukleáza ve formě proteinu či mRNA.

Nejvíce využívaná technika pro vložení chtěného úseku genetické informace do genomu zahrnuje využití pouze 1 sekvence gRNA, tzv. 1-bait systém (Auer a kol., 2014). Tento způsob ovšem vede k vložení celého vytvořeného konstrukt (obecně plazmidu) do genomu živočicha. Pro vložení genové kazety bez nadbytečné kostry plazmidu, která by mohla ovlivňovat následný průběh vývoje byl vytvořen takzvaný 2-bait systém. Tento systém využívá navázání gRNA na 2 stejné homologní sekvence plazmidu, což vede k přesné integraci exogenní sekvence do genomu organismu. (Mao a kol., 2018). Pro lepší pochopení jsem vytvořila obrázek č. 13, který znázorňuje ideální vložení exogenní sekvence obou systémů. V obou případech je ovšem šance 50:50 na vložení sekvence ve správné orientaci. U 2-bait systému je také možnost, že dojde k vložení pouze nechtěné sekvence obsahující zbývající kostru plazmidu, namísto sekvence chtěné. S tímto problémem se ovšem můžeme vypořádat například tím, že společně s genem našeho zájmu vložíme také reportérový gen s jeho vlastním silným promotorem, díky čemuž můžeme selektovat jedince se správným vloženým konstruktem.



Obrázek 13: Systémy vložení cizorodé DNA sekvence do genomu (A): 1-bait systém využívající 1 homologní sekvence v plazmidu, což po proběhnutí homologní rekombinace ústí k vložení celé sekvence plazmidu do genomu (B): 2-bait systém využívající 2 stejných homologních sekvencí v plazmidu, což má za následek vložení pouze jimi ohraničené chtěné sekvence.

3. Cíle práce

V laboratoři školitele byla založena buněčná kultura XtiSC ze společných progenitorů Sertoliho a peritubulárních myoidních buněk izolovaných z juvenilního samce *X. tropicalis*. Mezi zajímavé vlastnosti Sertoliho buněk patří produkce trofických faktorů, které zajišťují proliferaci zárodečných buněk a jejich imunomodulační funkce. Buněčná kultura XtiSC vykazuje mnohé vlastnosti MSC, které jsou velmi studovaným buněčným typem pro jejich imunomodulační a proregenerativní vlastnosti. Jelikož Sertoliho buňky jsou ve varlatech lokalizovány v imunologicky privilegované oblasti, kde regulují imunitní odpověď, je možné, že schopnost XtiSC regulovat imunitní systém v procesu regenerace je stejná či dokonce vyšší než u MSC. Mikroenkapsulované prasečí Sertoliho buňky také po injekci do peritonea myši s mutací zabraňující syntéze dystrofinu vedly k redukci nekrózy, fibrózy a uložení tukové tkáně. Jejich injekce navíc indukovala produkci utrofinu, který je strukturním i funkčním paralogem dystrofinu (Chiappalupi a kol., 2017).

Cílem této práce bylo ověřit, zda XtiSC vykazují imunomodulační potenciál, který ovlivňuje schopnost regenerace u pulců *X. tropicalis* po amputaci ocasu. Za tímto účelem jsme stanovili dílčí cíle práce:

- 1) Prokázat, zda injekce buněčné kultury XtiSC ovlivní počty makrofágů u pulců *X. tropicalis*
- 2) Prokázat, zda má deplece makrofágů vliv na migraci XtiSC do místa poranění u pulců *X. tropicalis*
- 4) Zaznamenat změnu množství produkce oxidu dusnatého v místě amputace ocasu po depleci makrofágů injekcí klorosomů a po injekci XtiSC u pulců *X. tropicalis* a prokázat jeho produkci buněčnou kulturou XtiSC.
- 5) Pozorování míry kompletní regenerace ocasu 7 dní po amputaci u níže definovaných experimentálních skupin pulců *X. tropicalis*
- 3) Prokázat, zda dojde k ovlivnění počtu satelitních buněk injekcí XtiSC a deplecí makrofágů u pulců *X. tropicalis*
- 6) Příprava knock-in transgenní linie *X. tropicalis* exprimující EGFP pod Pax7 promotorem pomocí metody CRISPR-Cas9 k vizualizaci Pax7+ satelitních buněk *in vivo*.

4. Materiál

4.1. Živý materiál

4.1.1. Pokusná zvířata

Pro všechny experimenty byly použity žáby *X. tropicalis* kmene Nigerian Strain pořízené od společnosti European Xenopus Resource Center.

4.1.2. Buněčná kultura

V laboratoři školitele byla založena buněčná kultura progenitorů Sertoliho buněk a peritubulárních myoidních buněk z varlat juvenilního samce *X. tropicalis* kmene Ivory Coast stáří 5 – 6 měsíců zvaná XtiSC.

4.2. Média

4.2.1. Kultivační médium

L-15 Leibovitz (Sigma-Aldrich) 33,33% (150 ml)

RPMI 1640 HEPES mod. (82 mg/ml) (Sigma-Aldrich) 6,66% (30 ml)

FBS (Life Technologies) 10% (45 ml)

L - glutamin (2 mM) (Sigma-Aldrich) 1% (4,5 ml)

7,5% NaHCO₃ (Sigma-Aldrich) 1,77% (8 ml)

gentamycin (50 µg/ml) 0,1% (450 µl)

pyruvát sodný (1 mM) (Sigma-Aldrich) 0,66% (3 ml)

deionizovaná H₂O 46,45% (209,05 ml)

4.3. Roztoky

4.3.1. Roztoky pro IVF a mikroinjekce

- 20× MMR (2M NaCl; 40 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 40 mM CaCl₂; 100mM HEPES; deionizovaná H₂O; pH 7,7 – 7,8)

- 1× MMR + Gentamycin (5 ml 20× MMR; 95 ml deionizované H₂O; 100 µl Gentamycinu; pH 7,7 – 7,8)

- 0,05× MMR (2,5 ml 20× MMR; 997,5 ml deionizované H₂O; pH 7,7 – 7,8)

- 0,05× MMR + Gentamycin (2,5 ml 20× MMR; 997,5 ml deionizovaná H₂O; 1 ml Gentamycin; pH 7,7 – 7,8)

- 1% roztok agarózy v 0,05× MMR 222
- 6% roztok Ficollu v 0,1x MMR s gentamycinem
- 0,1% roztok BSA v 0,05 MMR s gentamycinem
- 2,2% roztok cysteinu (0,5 ml 20× MMR; 99,5 ml deionizovaná H₂O; 2,2 g L- cystein; pH 7,7 – 7,8)
- 0,2% MS-222 = uspávací roztok (2 g MS-222; 0,2 g NaHCO₃; 100 ml destilovaná H₂O)
- 0,4% MS-222 = usmrcovací roztok (2 g MS-222; 2 g NaHCO₃; 500 ml destilovaná H₂O)

4.4. Kity pro přípravu vektoru exprimujícího EGFP pod Pax7 promotorem

- E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (Omega)
- Microelute Gel extraction Kit (Omega)
- Plasmid Midi Kit (Qiagen)

4.5. Ostatní materiál pro přípravu vektoru exprimujícího EGFP pod Pax7 promotorem

- TrueCut HiFi Cas9 protein (Thermo Fisher Scientific)
- TrueGuide gRNA (Thermo Fisher Scientific)

4.6. Primární a sekundární protilátky

Antigen	Hostitel	Výrobce	Ředění
Pax7	Mouse	Novus Biologicals	1:400
RFP	Rabbit	Evrogen	1:2000
Rabbit IgG-Alexa Fluor® 594 conjugate	Goat	Thermo Fisher Scientific	1:500
Mouse IgG-Alexa Fluor® 488 conjugate	Goat	Thermo Fisher Scientific	1:500

Tabulka 1: Primární a sekundární protilátky

4.7. Chemikálie

- Agaróza 50004 (Lonza)
- Bromfenolová modř (50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM) (Sigma Aldrich)
- Clodronate Liposomes (Liposoma)
- Control Liposomes (Liposoma)
- Cystein C7352 (Sigma-Aldrich)
- DAF-2DA 85165 (Cayman chemicals)

- DAPI DES1000L (Intimex)
- 6× DNA Loading Dye R0611 (Fermentas)
- Fluorescent Dil Liposomes (Liposoma)
- Gene Ruler DNA Ladder mix (SM0333, Fermentas)
- Gentamycin – Gentaveto – 5 (V.M.D.)
- Lidský hCG C1063 (Sigma-Aldrich)
- Montovací médium (Mowiol/DAPI)
- MS-222 (Sigma-Aldrich)
- Papain preparation (61,25 µg/ml) (L2223, Biochrom AG)
- Skleněné kapiláry typu 1-000-0500 (Drummond)
- 0,5% Triton X -100 v 2/3 PBS
- Trypan Blue stain 0,4% (T 10282, Life Technologies™)

4.8. Použité přístroje

- Centrifuga Eppendorf 5810 R (Eppendorf)
- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga Hettich Mikro 185 (Hettich Zentrifugen)
- Countess Automated Cell Counter (Invitrogen)
- Flow box EM Box 120 (Schoeller Instruments)
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX40F (Olympus Optical)
- Fluorescenční stereomikroskop Olympus SZX16 (Olympus Optical)
- Inkubační třepačka JeioTech IST-3075 (JeioTech)
- Inverzní mikroskop Leica Dmi1 (Leica)
- Inverzní mikroskop Olympus IX 71 (Olympus Optical)
- Kryomikrotom Leica CM1860 UV (Leica)
- Mikroinjektor IM 400 se sacím modulem IM 400B (Narishige)
- Nanodrop ND-1000 (NanoDrop)
- pH metr Milwaukee Mi 151 (Milwaukee)
- Stereomikroskop Stemi 2000 (Zeiss)
- Transmisní základna Leica TL3000 (Leica)

- Třepačka Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Vodní lázeň Techne TE 10D Tempette (Techne)
- Vyhřívaný blok Eppendorf ThermoMixerC (Eppendorf)
- XP cyclers (BIOER)

5. Metody

5.1. Kultivace XtiSC a jejich příprava pro mikroinjekce do krevního oběhu pulců

V rámci našich experimentů jsme pracovali s buněčnou kulturou XtiSC, která pochází z varlat samců *X. tropicalis* (kmen Ivory Coast) ve stáří 5 – 6 měsíců. Tyto buňky byly pomocí nukleofekce transfekovány DNA vektorem nesoucím gen pro červený fluorescenční protein Katushka RFP pod CAG promotorem. Takto připravená buněčná kultura (XtiSC-RFP) byla následně zamrazena v tekutém dusíku.

Po rozmrazení byly buňky kultivovány v termostatu při 29,5 °C a 5,5% atmosféře CO₂ a jednou do týdne pasážovány. Nejdříve bylo z lahve odsáto kultivační médium a k buňkám byl přidán roztok papainu po dobu 10 minut. Výsledná suspenze byla odsáta a přenesena do zkumavky. Pro ukončení enzymatického působení byly do zkumavky přidány 3 ml kultivačního média, které obsahuje fetální bovinní sérum a zkumavka byla poté zcentrifugována při 900 rpm po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl odlit supernatant a zbylá peleta byla resuspendována v 1 ml kultivačního média. Podle stanovené koncentrace buněčné suspenze bylo do kultivační lahve s 19 ml kultivačního média vloženo cca 200 µl buněk. Zbylé buňky v médiu bylo možno použít pro transplantační experimenty, pro které byly buňky znovu zcentrifugovány (5 minut při 900 rpm) a resuspendovány v 1 ml 2/3 PBS.

5.2. IVF

Čtyřem samicím *X. tropicalis* bylo večer před IVF každé injikováno 30 mezinárodních jednotek (IU) hCG a 300 IU hCG následující den ráno. Přibližně po 4-6 hodinách byly ze samiček mírným tlakem v oblasti břišní dutiny přirozenou cestou odebrány oocyty do velké kapky 1x MMR roztoku na Petriho misce. Pro získání spermií byly usmrčenému samci *X. tropicalis* vyjmuta varlata a vložena do 0,5 ml testikulárního média, kde byla zhomogenizována. Vzniklá suspenze byla rovnoměrně nanášena na vrstvu ovulovaných oocytů a ponechána 5 minut pro navázání spermií na jejich povrch.

Pro zahájení fertilizace byl na oocyty nalit roztok 0,05x MMR (fertilizaci zahájila změna koncentrace iontů v roztocích). Po 20 minutách byly oocyty 5 minut inkubovány v roztoku cysteinu kvůli odstranění gelového obalu. Poté následovalo 4x promytí roztokem 0,05x MMR a následné přenesení oocytů na Petriho misku vylitou tenkou vrstvou agarózy a 0,05x MMR s

gentamycinem. Po 1 hodině byla selektována fyziologicky se vyvíjející embrya ve 4 buněčném stádiu, která se přenášela na velké Petriho misky (d=15 cm) s agarózou a 0,05x MMR s gentamycinem. Na jedné misce bylo kultivováno maximálně 200 embryí. Třetí den byla embrya přenesena do nových velkých Petriho misek, tentokrát bez agarózového podkladu s 0,05x MMR bez přídavku gentamycinu. Čtvrtý den byli již pulci přeneseni do provzdušněných tanků s vodou s přídavkem mořské soli a hladinou konduktivity 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a tento den začali být také krmeni.

5.3. Mikroinjekce klodrosomů pro depleci makrofágů do krevního oběhu pulců

Protokol pro mikroinjekci klodrosomů do pulců *X. tropicalis* nebyl nikdy vytvořen, podle literálních údajů (Aztekin a kol., 2020) jsme tedy dopočítali účinnou dávku klodrosomů na hmotnost pulce *X. tropicalis*. Pro zjištění, zda nejsou výsledky ovlivněny samotnou mikroinjekcí do pulců byly do kontrolní skupiny mikroinjikovány prázdné liposomy neobsahující klodronát. Injekce klodrosomů byla provedena na 14 dnech starých pulcích ve stádiu 47-50. Pulcům bylo mikroinjikováno 6,44 nL suspenze klodrosomů a pro úplnou depleci makrofágů musela být mikroinjekce provedena 2x ve dvou po sobě jdoucích dnech.



Obrázek 14: Mikroinjekce klodrosomů do krevního oběhu pulce.

5.4. Mikroinjekce XtiSC do krevního oběhu pulců

Vždy 3. den po mikroinjekci první dávky klodrosomů byly pulcům mikroinjikovány XtiSC v 2/3 PBS. Pro lepší manipulaci byli pulci uspáni na Petriho misce v 0,2% MS-222. Pulci byli přidržováni na boku těla holdingovou kapilárou a pomocí mikroinjektoru byla do skleněné kapiláry nasáta buněčná suspenze, která byla vpravena do dorzální žíly ocasu v objemu 40 nL na 1 pulce (přibližně 1000 buněk). Vysoká životaschopnost injikovaných buněk byla udržována pravidelnou výměnou buněčné suspenze v mikroinjekční kapiláře.

Po mikroinjekci XtiSC byli pulci po dobu 1 dne kultivováni na Petriho miskách v 0,05x MMR s přidavkem gentamycinu. Po uplynutí jednoho dne byla pulcům amputována 1/3 ocasu a pulci byli opět navraceni do 0,05x MMR s přidavkem gentamycinu. Následující den byli vloženi do tanků s vodou s přidavkem mořské soli.

Pro studium deplece makrofágů i pro zaznamenání počtu satelitních buněk, XtiSC a oxidu dusnatého byli pulci odebíráni pro řezy na kryomikrotomu ve dnech 1 dpa (dpa – den po amputaci ocasu), 3 dpa a 7 dpa. V tyto dny byli odebíráni pulci ze všech 4 vytvořených základních skupin (viz tabulka č. 2). Jako negativní kontrola reakce imunitního systému na mikromanipulaci pulci sloužila skupina s kontrolním liposomem. Pulci byli také rozděleni podle toho, zda byli, či nebyli mikroinjikováni XtiSC buňkami.

Kontrolní liposom - XtiSC	Kontrolní liposom + XtiSC	Klodrosom - XtiSC	Klodrosom + XtiSC
------------------------------	------------------------------	----------------------	----------------------

Tabulka 2: Experimentální skupiny pulců *X. tropicalis*

5.5. Imunohistologické barvení kryomikrotomových řezu

Pro přípravu kryomikrotomových řezů byli pulci přes noc fixováni při +4 °C ve 4% paraformaldehydu ředěném 2/3 PBS, následující den promyti 3x5 minut v 2/3 PBS a vloženi do roztoku 20% sacharózy, kde byli v +4 °C ponecháni přes noc. Následující den byli pulci zaliti do formy (lékový blister) s OCT médiem a vloženi do -80 °C, kde byli skladováni pro histologické řezy provedené na kryomikrotomu. Řezy byly připravovány při nastavené teplotě -22 °C na šířku řezu 8 μm.

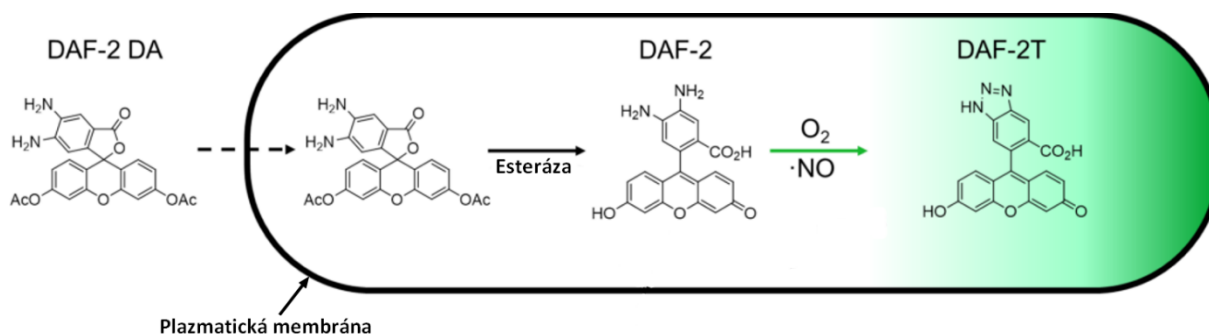
Následně byly řezy 3x5 minut promyty v 2/3 PBS, fixovány ve 4 % paraformaldehydu v PBS po dobu 10 minut a znova 3x promyty ve 2/3 PBS po 5 minutách. Následovala permeabilizace membrán pomocí 0,1% TritonuX-100 ve 2/3 PBS po dobu 30 minut a promytí 3x5 minut 2/3 PBS. Dále byly řezy 1 hodinu inkubovány v TNB a nakonec 1 hodinu inkubovány ve fluorescenčně značeném isolektinu B4 (1:100 ředěn v TNB) při pokojové teplotě. Poté byly 3x5 minut promyty ve 2/3 PBS a zality několika kapkami Mowiol/DAPI, na které bylo dáno krycí sklo. Výsledné řezy byly snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Pro barvení satelitních buněk byl protokol upraven. Aby byla zajištěna lepší permabilizace byly řezy inkubovány v 0,5% TritonuX-100 po dobu 1 hodiny. Namísto inkubace v izolektinu byly řezy inkubovány v primárních protilátkách přes noc v +4 °C. Druhý den byly

3x5 minut promyty v 0,1% Tritonu-X100 v 2/3 PBS a následně inkubovány v sekundárních protilátkách po dobu 2 hodin při pokojové teplotě.

5.6. Studium produkce oxidu dusnatého po amputaci ocasu

Pro stanovení produkce oxidu dusnatého bylo využito DAF-2DA (diaminfluorescein 2-diacetát) sondy. Tato sonda díky své hydrofobicitě volně prochází plazmatickými membránami do cytosolu, kde je rozpoznána esterázami, které odštěpí její acetátové skupiny a dají vznik 4,5-diaminofluoresceinu (DAF-2). Ten následně reaguje s oxidačním produktem oxidu dusnatého N_2O_3 , čímž vznikne zeleně fluorescenční triazol fluorescein (DAF-2T). (viz obrázek č.15).



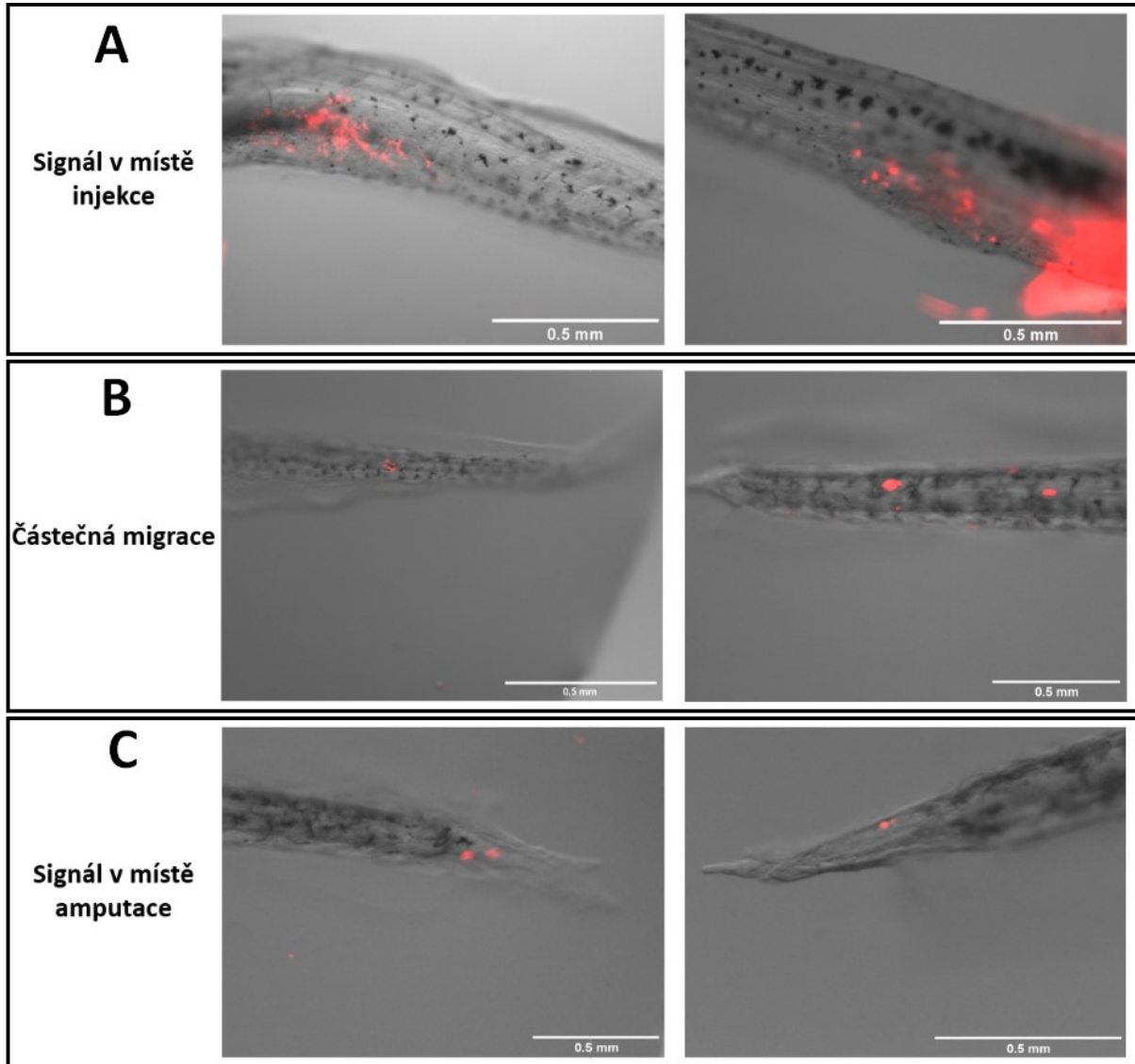
Obrázek 15: Princip působení DAF-2DA sondy (upraveno dle www.goryochemical.com).

Pulcům byly injikovány ve dvou po sobě jdoucích dnech klodrosomy či kontrolní liposomy a následně po dvou byly tyto dvě skupiny rozděleny každá na další dvě, jedna s mikroinjekcí buněčné kultury XtiSC, druhá bez této mikroinjekce. 1 den po mikroinjekci buněčné kultury XtiSC byla pulcům ve všech 4 experimentálních skupinách amputována 1/3 ocasu. Následně byla pulcům ve dnech 1 dpa a 3 dpa na fluorescenční binolupě snímána produkce oxidu dusnatého, čemuž předcházelo 3x promytí pulců v 0,05x MMR a jejich následná inkubace v zásobním roztoku DAF-2DA (5mM v DMSO) naředěným v poměru 1:150 v 0,05x MMR po dobu 15 minut.

5.7. Studium migrace XtiSC do místa poranění po amputaci ocasu

Schopnost XtiSC migrovat do místa amputace ocasu byla zaznamenávána 3. den po amputaci pomocí fluorescenčního stereomikroskopu Olympus SZX16 (Olympus Optical). Pro lepší pozorování byli pulci uspáni na Petriho misce v 0,2% MS-222. Podle schopnosti migrace XtiSC do místa poranění byli pulci rozděleni do 3 skupin:

- signál v místě injekce (a tedy žádná migrace)
- částečná migrace
- signál v místě amputace



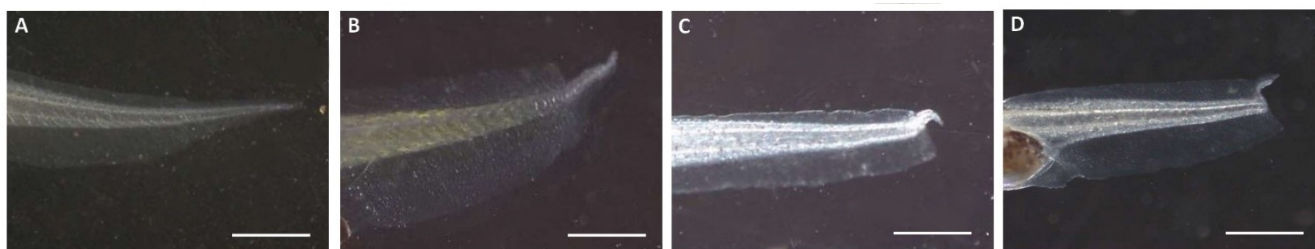
Obrázek 16: Hodnocení migrace XtiSC do místa amputace ocasu 3 dpa pomocí fluorescenční binolupy (A): RFP signál v místě injekce buněčné kultury XtiSC, tedy bez jakékoliv migrace (B): Částečná migrace XtiSC k místu amputace ocasu (C): RFP signál XtiSC v místě amputace ocasu.

5.8. Pozorování schopnosti regenerace ocasu po amputaci

Týden po amputaci ocasu pulce byla pozorována míra schopnosti regenerace jednotlivých pulců určených skupin pomocí Leica TL3000 Ergo transmisní základny. Hodnocení probíhalo podle kritérií jmenovaných v následující tabulce:

Míra regenerace:				
	Excelentní	Dobrá	Částečná	Žádná
Délka ocasu	Odpovídá původní délce	Odpovídá původní délce	Kratší než původní délka	Odpovídá délce po amputaci
Napojení chordy, míchy a vaskulatury	Přesné vodorovné napojení	Částečné vychýlení z vodorovné osy	Až kolmé vychýlení z vodorovné osy	Žádné napojení
Celkový vzhled	Zcela jako před amputací	Velmi podobný vzhledu před amputací	Částečná obnova tkáně po amputaci	Po amputaci bez jakékoliv obnovy, pouze obnova povrchové epidermis

Tabulka 3: Kritéria hodnocení míry regenerace ocasu u pulců *X. tropicalis* 7 dpa



Obrázek 17: Hodnocení míry regenerace ocasu 1 týden po jeho amputaci (A): Excelentní (B): Dobrá (C): Částečná (D): Žádná; měřítko ukazuje 1 mm.

5.9. Mikroinjekce roztoku pro CRISPR Cas9 obsahujícího DNA vektor, gRNA a Cas9 protein do 1 buněčného embrya *X. tropicalis*

Jednobuněčná embrya určená k mikroinjekci roztoku pro CRISPR-Cas9 byla připravena pomocí IVF s upraveným postupem popsáným níže. Před samotnými mikroinjekcemi byl vytvořen roztok obsahující 400 ng/μl Cas9 proteinu, 50 ng/μl gRNA a 150 ng/μl purifikovaného plazmidu. Do každého embrya bylo injikováno 2 nl tohoto roztoku. Při posledních provedených mikroinjekcích byla snížena koncentrace gRNA na 30 ng/μl a námi vytvořeného plazmidu na 100 ng/μl.

Pro odběr varlat byli použiti 1 či 2 samci *X. tropicalis*. Izolovaná varlata byla přenesena do 300 ul testikulárního média. Těsně před oplozením byla varlata zhomogenizována a výsledná suspenze pak nanášena na nakladené oocyty v 1x MMR médiu. Další změnou byla doba oplození vajíček, která byla zkrácena z 20 na 10 minut (z důvodu získání více času na mikroinjekce do 1 buněčného stádia). Od aktivace oplozených oocytů jejich zalitím 0,05x MMR začal běžet čas 45 min, který odpovídá době vzniku první rýhy a tím i dvoubuněčných embryí.

Všechny mikroinjekce do embryí prováděl školitel doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.. Aby nedocházelo k uchycení embryí ke dnu Petriho misky, byly misky předem omyty 0,1% roztokem BSA v 0,05x MMR s gentamycinem. Všechna embrya byla pro lepší manipulaci umístěna do 6% roztoku Ficollu v 0,1x MMR s gentamycinem na 6 cm Petriho misku, ve kterém byla ponechána do 4 buněčného stádia. Následně byla přenesena do 9 cm Petriho misky zalité 0,05x MMR, kde byla ponechána pro jejich následný vývoj.

Cíl gRNA	Výrobce	Sekvence
Poslední intron Pax7	Invitrogen™ TrueGuide™ gRNA	GGCCCTGGAATGGCCTTAAA
Poslední intron Pax7	Invitrogen™ TrueGuide™ gRNA	GGATGTAAATGATAAGTGTT

Tabulka 4: Seznam použitých gRNA pro navedení Cas9 proteinu na cílové sekvence posledního intronu Pax7 v genomu *X. tropicalis*. Pro vybrání cílové sekvence byly využity programy CHOPCHOP a CRISPRscan.

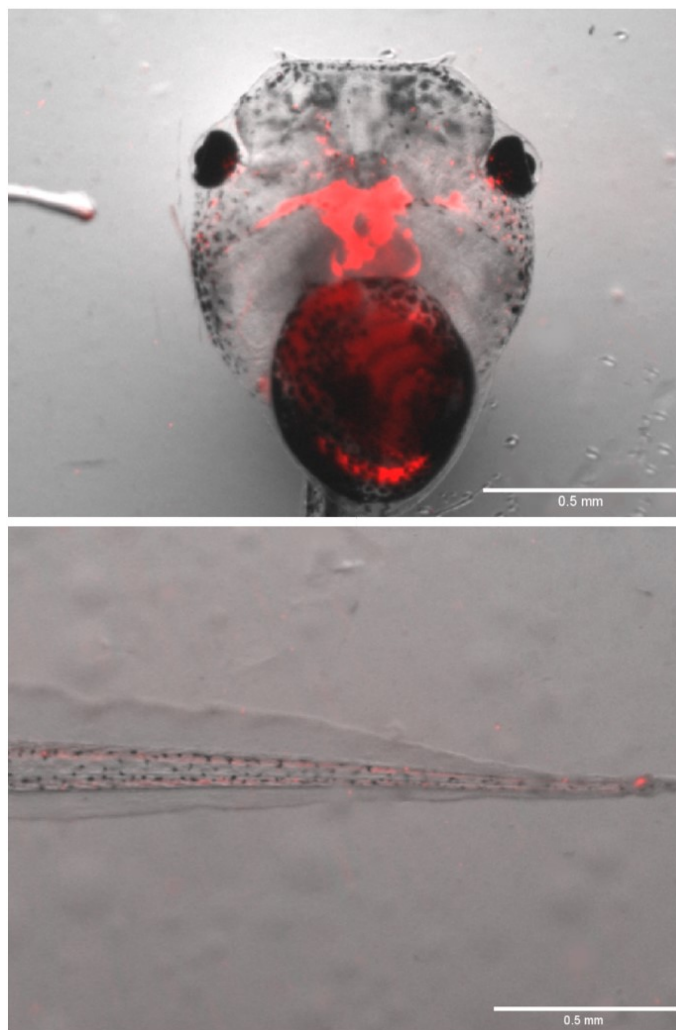
5.10. Statistická analýza

Všechny pokusy byly zopakovány alespoň 3x nezávisle za sebou. K vyhodnocení vlivu klodrosomů a XtiSC na počet makrofágů a satelitních buněk byl použit Studentův t-test. Pro vyhodnocení vlivu makrofágů na migrační potenciál XtiSC a míry regenerace ocasu byl využit Chí-kvadrát test.

6. Výsledky

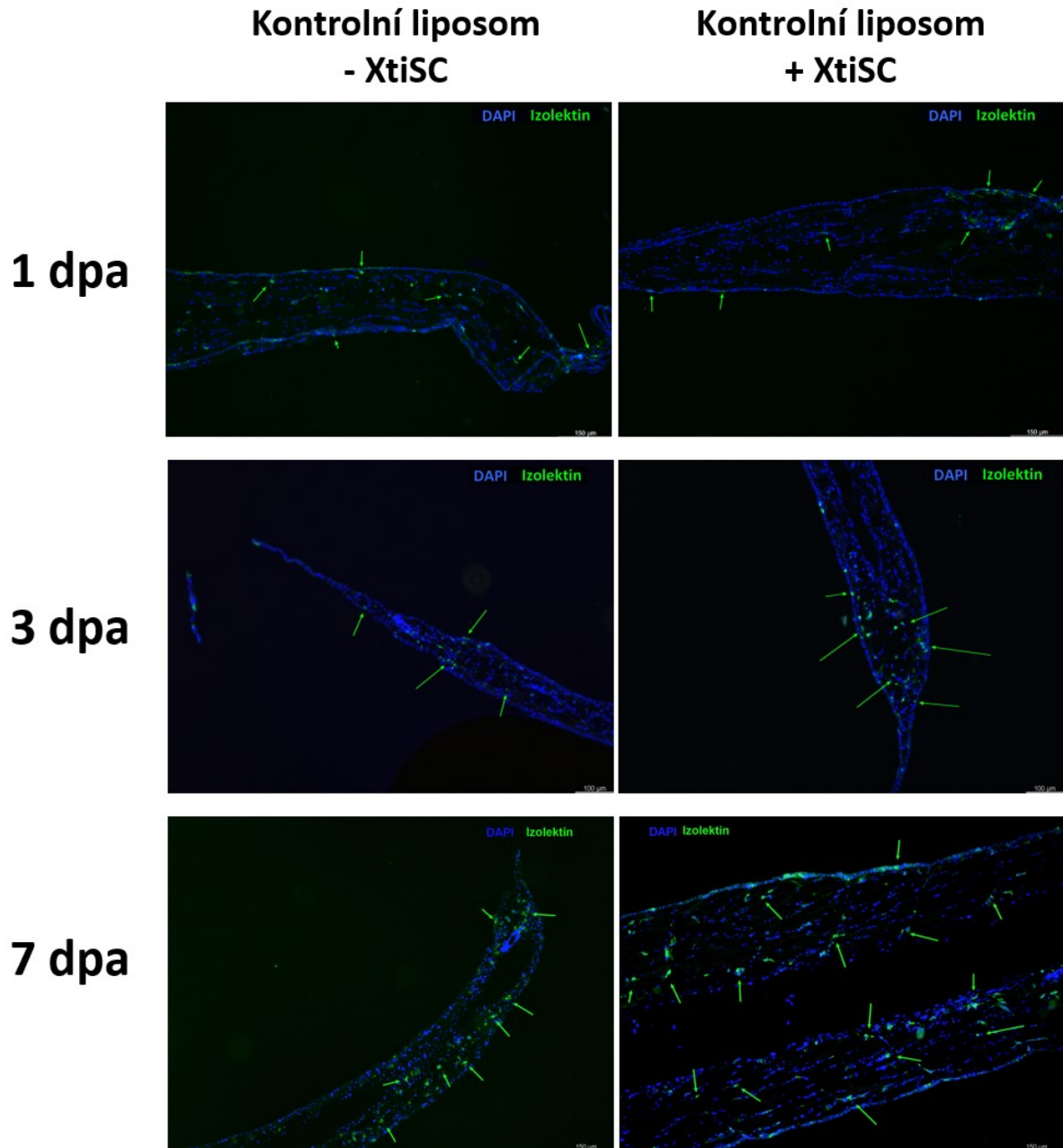
6.1. Studium vlivu XtiSC na počty makrofágů u experimentálních skupin pulců *X. tropicalis*

Abychom mohli studovat jakou roli mají makrofágy v interakci s naší buněčnou kulturou XtiSC na regeneraci ocasu pulců *X. tropicalis*, museli jsme provést jejich depleci pomocí mikroinjekce klodrosomů do dorzální žíly pulců v blízkosti srdce. Pro zjištění, zda se při této formě mikroinjekce dostanou klodrosomy do celého krevního oběhu pulce jsme jako první mikroinjikovali fluorescenčně značené liposomy, které jsou stejně jako klodrosomy fagocytovány makrofágy. Jak je viditelné na obrázku č. 18, červený fluorescenční signál byl přítomný v krevním oběhu pulce hlavy i ocasu po několik dní a mohli jsme tedy naši metodu mikroinjekce považovat za účinnou.

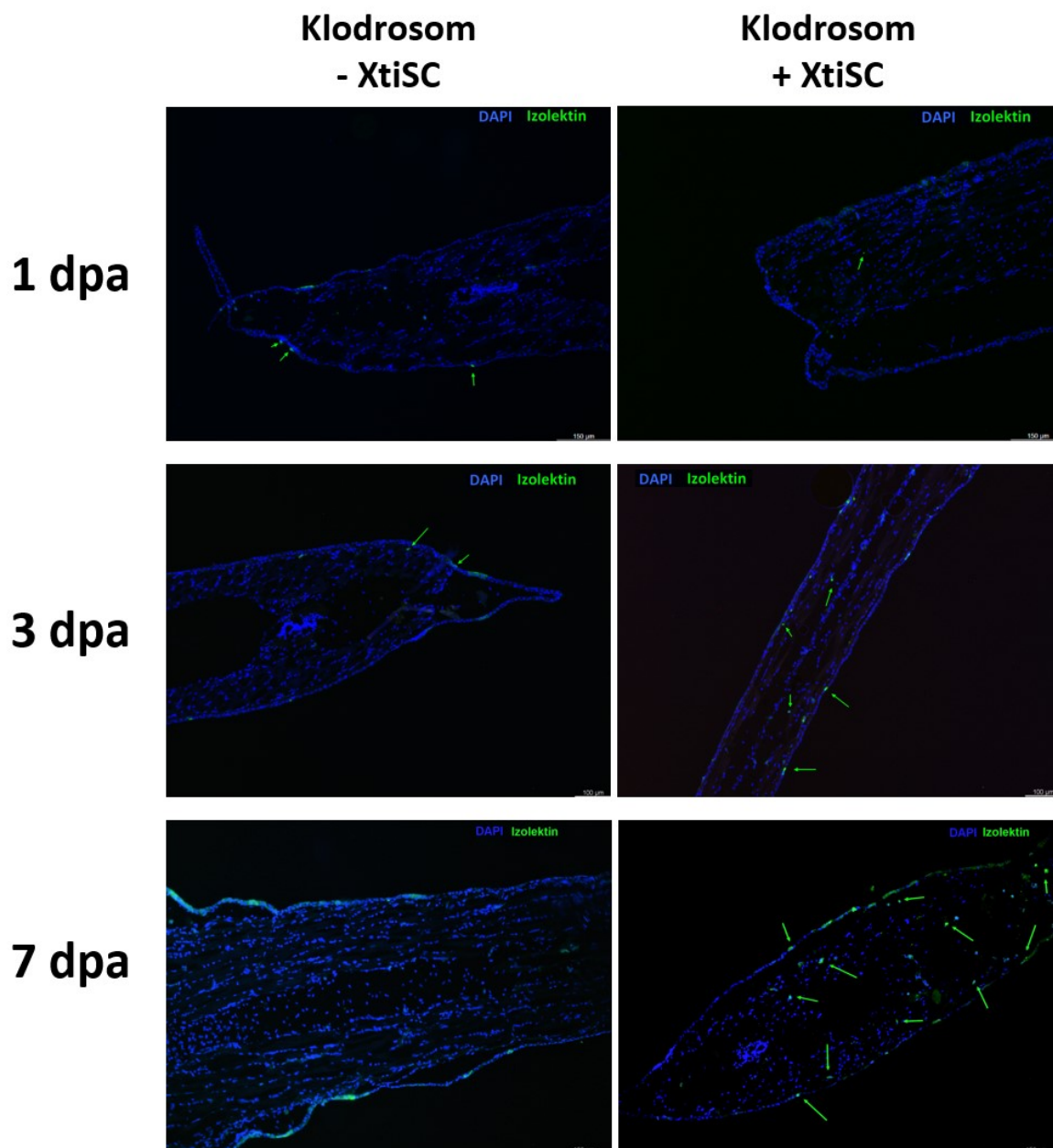


Obrázek 18: Vyobrazení fluorescenčně značených liposomů v krevním oběhu pulce.

Pro depleci makrofágů byli pulci mikroinjikováni klodrosomy a jako negativní kontrola sloužili pulci mikroinjikováni prázdnými kontrolními liposomy. Pro objasnění, zda XtiSC ovlivňují regeneraci, či dokonce do určité míry nahrazují funkci makrofágů byly tyto skupiny navíc rozděleny na další dvě skupiny podle toho, zda pulcům byla či nebyla mikroinjikována kultrura XtiSC. Následně byli pulci fixováni, dehydratováni a uloženi do -80 °C v OCT médiu, kde byli uchováni pro následnou disekci na kryomikrotomu. Výsledné řezy pulců byly nabarveny pomocí izolektinu konjugovaného s fluoresceinem a následně snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Z každého pulce byly vytvořeny nejméně 4 řezy podélně jeho ocasem, ze kterých byl následně zjištěn počet makrofágů. Aby nedošlo k ovlivnění výsledků odlišnými velikostmi ploch řezů, ze kterých byl počet makrofágů počítán, byl jejich výsledný počet vydělen součtem ploch analyzovaných řezů, (tj. $\frac{\text{počet makroágů v ocasu pulce}}{\text{součet ploch analyzovaných řezů}}$). Plochy řezů byly vypočítány v programu ImageJ.

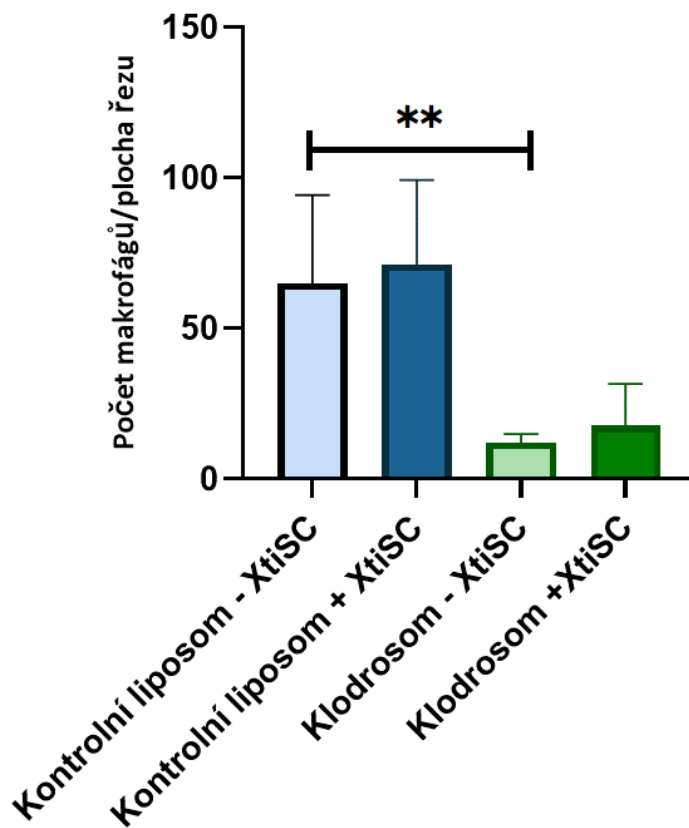


Obrázek 19: Řezy ocasy pulců injikovaných kontrolními liposomy 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa. Snímky byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu. Šipky ukazují na výrazný zelený signál fluoresceinu konjugovaného s izolektinem, který detekuje makrofágy. Měřítka ukazují 150 μm .



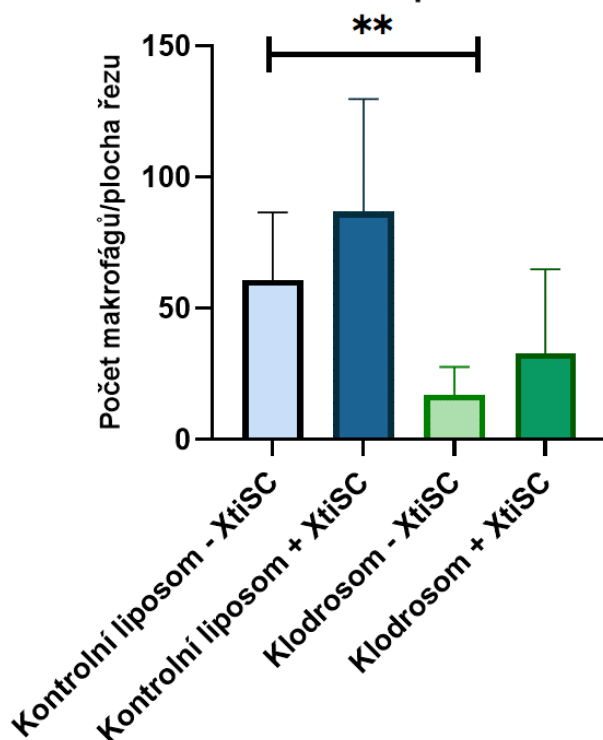
Obrázek 20: Řezy ocasy pulců injikovaných klodrosomy 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa. Snímky byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu. Šipky ukazují na výrazný zelený signál fluoresceinu konjugovaného s izolektinem, který detekuje makrofágy. Měřítka ukazují 150 µm.

Počet makrofágů v experimentálních skupinách 1 dpa

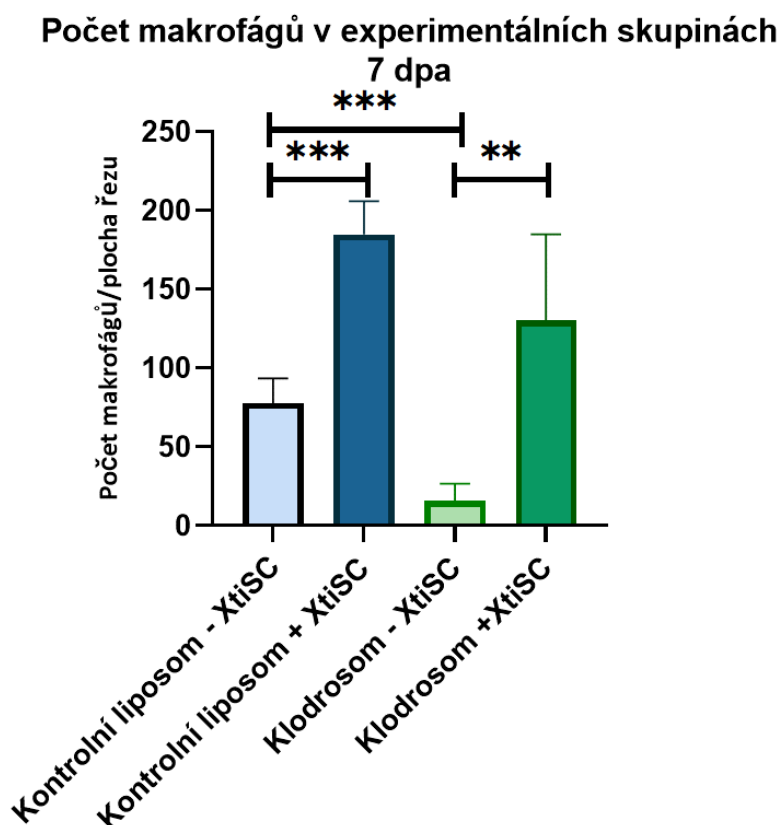


Obrázek 21: Počet makrofágů v experimentálních skupinách pulců 1 dpa. Pro hodnocení výsledků byly vytvořeny řezy z nejméně 5 pulců každé experimentální skupiny. Z každého pulce byly zhotoveny nejméně 4 řezy podélně ocasem, ve kterých byl následně vypočítán počet makrofágů, který byl vydělen součtem ploch analyzovaných řezů. Ve skupině injikované klodrosomy došlo k signifikantnímu snížení ($P < 0,002$) počtu makrofágů oproti skupině injikované kontrolními liposomy. Rozdíl mezi skupinami injikovanými XtiSC a bez injekce XtiSC není kvůli velkým rozptylům hodnot statisticky významný. Pro vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test (* značí $P < 0,033$, ** značí $P < 0,002$, *** značí $P < 0,001$).

Počet makrofágů v experimentálních skupinách 3 dpa



Obrázek 22: Počet makrofágů v experimentálních skupinách pulců 3 dpa. Pro hodnocení výsledků byly vytvořeny řezy z nejméně 5 pulců každé experimentální skupiny. Z každého pulce byly zhotoveny nejméně 4 řezy podélně ocasem, ve kterých byl následně vypočítán počet makrofágů, který byl vydělen součtem ploch analyzovaných řezů. Ve skupině injikované klodrosomy došlo k signifikantnímu snížení ($P < 0,002$) počtu makrofágů oproti skupině injikované kontrolními liposomy. Rozdíl mezi skupinami injikovanými buněčnou kulturou XtiSC a bez injekce XtiSC není kvůli velkému rozptylu hodnot statisticky významný. Pro vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test (* značí $P < 0,033$, ** značí $P < 0,002$, *** značí $P < 0,001$).



Obrázek 23: Počet makrofágů v experimentálních skupinách pulců 7 dpa. Pro hodnocení výsledků byly vytvořeny řezy z nejméně 5 pulců každé experimentální skupiny. Z každého pulce byly zhotoveny nejméně 4 řezy podélně ocasem, ve kterých byl následně vypočítán počet makrofágů, který byl vydělen součtem ploch analyzovaných řezů. Ve skupině injikované klodrosomy došlo k signifikantnímu snížení ($P < 0,001$) počtu makrofágů oproti skupině injikované kontrolními liposomy. U skupiny klodrosomu jak kontrolního liposomu došlo po injekci XtiSC ke statisticky významnému nárůstu počtu makrofágů oproti skupině bez XtiSC ($P < 0,001$ u kontrolního liposomu, $P < 0,01$ u klodrosomu). Pro vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test test (* značí $P < 0,033$, ** značí $P < 0,002$, *** značí $P < 0,001$).

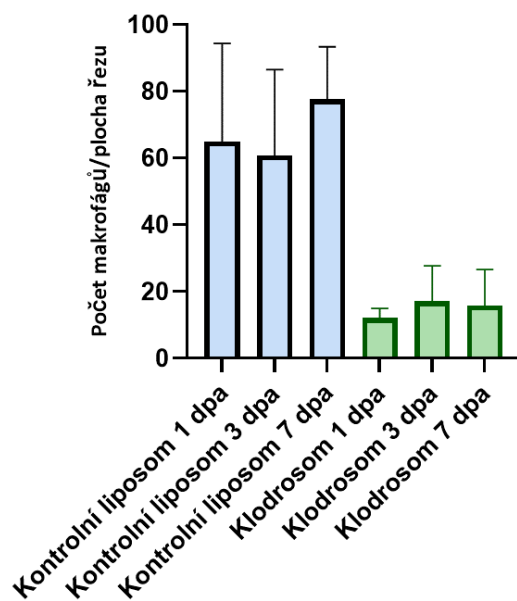
Při porovnání počtu makrofágů mezi skupinami injikovanými kontrolními liposomy a klodrosomy se ukázala deplece makrofágů pomocí klodrosomů účinná ve všech 3 pozorované dny.

Injekce XtiSC vedla ke statisticky významnému navýšení makrofágů pouze 7 dpa, a to jak u skupiny kontrolního liposomu ($P < 0,001$), tak klodrosomu ($P < 0,002$). XtiSC jsou tedy díky produkci NO schopny zvýšit počet makrofágů pouze 7 dpa.

Je nutno zmínit, že u pulců injikovaných klodrosomy docházelo často k jejich úmrtí oproti pulcům injikovaným kontrolními liposomy. Tato skutečnost pouze potvrzuje fakt, že makrofágy jsou opravdu nezbytné pro fyziologický vývoj pulců.

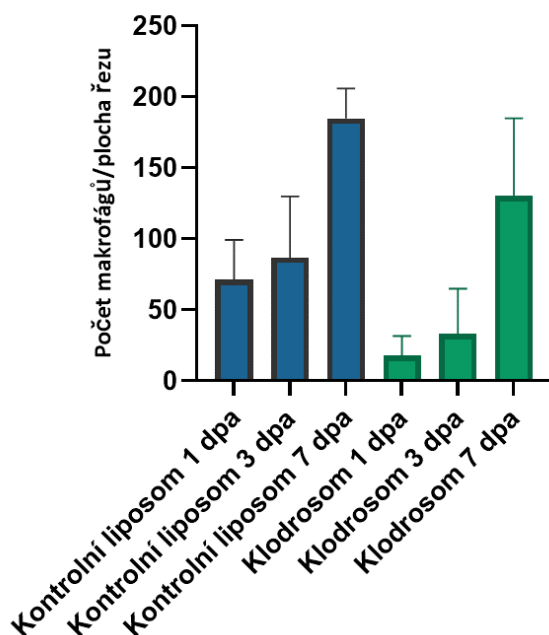
Dále jsme zjistili, že počet makrofágů se ve všech skupinách bez injekce XtiSC udržoval na stejné hladině (viz obrázek č. 24), zatímco u skupin injikovaných XtiSC s postupem času vzrůstal (viz obrázek č. 25). Již dříve bylo pozorováno, že XtiSC v místě své injekce vytváří určitou niku, kde se dále množí, je proto možné, že s postupem času došlo v pulcích k proliferaci buněk a vyloučení většího množství oxidu dusnatého, který následně podporoval množení makrofágů. Pokud by toto tvrzení bylo pravdivé, bylo by 7 dpa zaznamenáno největší množství oxidu dusnatého, což se při našem pozorování ovšem nepotvrdilo (viz dále).

Počet makrofágů u experimentálních skupin - XtiSC



Obrázek 24: Počet makrofágů u experimentálních skupin bez injekce XtiSC. Z grafu je patrné, že jak u kontrolního liposomu, tak u klodrosomu se udržovala hladina makrofágů ve dnech 1 dpa 3 dpa a 7 dpa na poměrně stejné hladině.

Počet makrofágů u experimentálních skupin + XtiSC

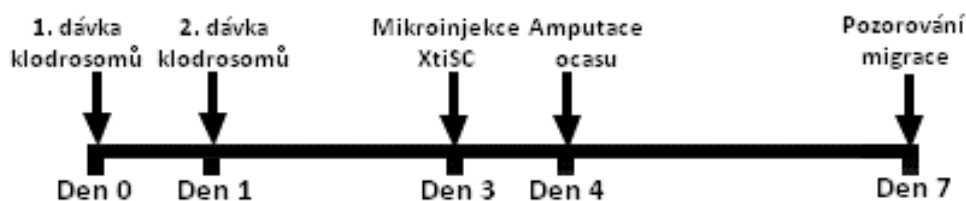


Obrázek 25: Počet makrofágů u experimentálních skupin s injekcí XtiSC. U obou experimentálních skupin došlo po injekci XtiSC k postupnému nárůstu počtu makrofágů ve dnech 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa.

6.2. Studium ovlivnění migračního potenciálu XtiSC makrofágy

V laboratoři školitele byla po mikroinjekci XtiSC do peritonea pulců potvrzena jejich migrační schopnost do srdce, pronefros a střeva (Tlapáková a kol., 2016). Neobjasněné však zůstávalo, zda je migrační schopnost XtiSC ovlivňována signálními molekulami. Jako vhodný kandidát této signální molekuly se nabízel oxid dusnatý, u kterého je prokázaná schopnost ovlivňování buněčné migrace u např. MSC, epidermálních kmenových buněk a keratinocytů (Zhan a kol., 2015; Fuseler a Valarmathi, 2016; Zhan a kol., 2016).

Významným producentem NO syntáz, které produkují oxid dusnatý v amputovaném ocasu jsou M1 makrofágy. Pro otestování, zda má produkce oxidu dusnatého makrofágy vliv na migraci XtiSC do místa poranění jsme pulcům ve stádiu 47-50 injikovali klodrosomy ve dvou po sobě jdoucích dnech, po 3 dnech od první mikroinjekce klodrosomů jsme do dorzální žíly a svalů ocasu mikroinjikovali XtiSC a následující den provedli amputaci ocasu. Následně jsme pozorovali migraci XtiSC k amputované části ocasu 3 dny po amputaci (3 dpa). Pro větší přehlednost jsem sestavila časovou řadu událostí, znázorněnou na obrázku č. 26.



Obrázek 26: Časová linie experimentu pozorování migrace XtiSC k místu amputace.

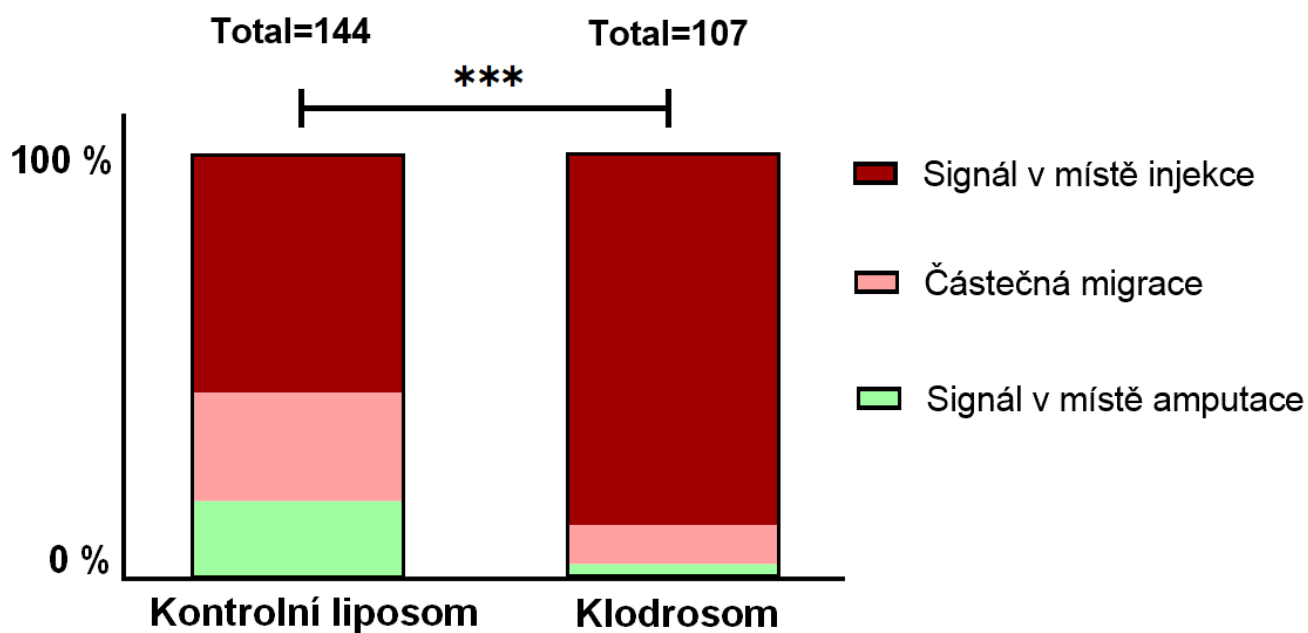
Migraci jsme hodnotili jako žádnou, tedy se signálem v původním místě injekce, částečnou a úplnou, tedy se signálem v místě amputace.

	Kontrolní liposom	Klodrosom
Signál v místě injekce	81 (56,25 %)	94 (87,85 %)
Částečná migrace	37 (25,7 %)	10 (9,34 %)
Signál v místě amputace	26 (18,05 %)	3 (2,8 %)
Celkem pulců	144 (100 %)	107 (100 %)

Tabulka 5: Migrační potenciál XtiSC k místu amputace ocasu. Znárodnění výsledného počtu pulců v jednotlivých skupinách podle migrační schopnosti XtiSC k amputované části ocasu 3 dpa.

Množství pulců s červeným fluorescenčním signálem XtiSC v místě jejich počáteční injekce, a tedy nulovou migrací bylo signifikantně vyšší u skupiny po injekci klodrosomy (87,85 %) než u kontrolní skupiny injikované kontrolními liposomy (56,25 %). Naopak množství pulců s úplnou či částečnou migrací k místu amputace bylo v kontrolní skupině s neovlivněnými počty makrofágů ztelně více (celkově 43,75 %) než tomu bylo u skupiny injikované klodrosomy (celkově 12,4 %). Tyto výsledky jsou v souladu s teorií, že makrofágy v amputované části ocasu ovlivňují schopnost migrace XtiSC sekrecí signálních molekul. Pro potvrzení výsledků získaných v předešlé diplomové práci, že jednou z těchto signálních molekul je oxid dusnatý jsme se rozhodli zaznamenávat produkci oxidu dusnatého pomocí DAF-2DA sondy ve dnech 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa.

Míra migrace XtiSC k místu amputace ocasu

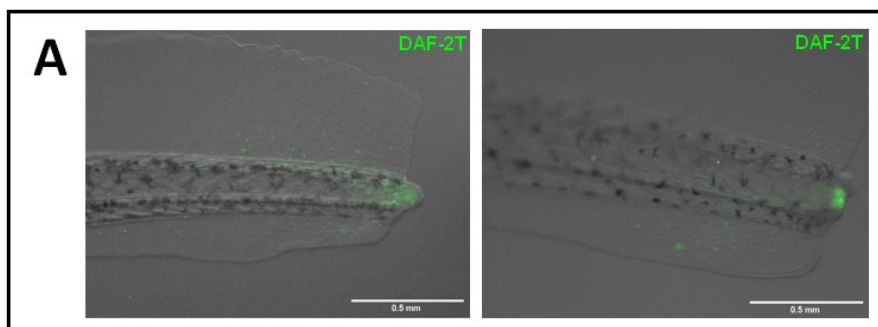


Obrázek 27: Míra migrace XtiSC k místu amputace ocasu. Častější migrace XtiSC k místu amputace ocasu byla pozorována u kontrolní skupiny injikované kontrolními liposomy (částečná migrace u 25,7 % a úplná migrace do místa amputace ocasu u 18,05 %), zatímco u skupiny s deplecí makrofágů díky injekci klodrosomů byla částečná migrace zaznamenána u 9,34 % a úplná migrace do místa amputace ocasu u 2,8 % pulců. Pro analýzu dat byl použit Chí-kvadrát test s hodnotou statistické významnosti $P < 0,001$.

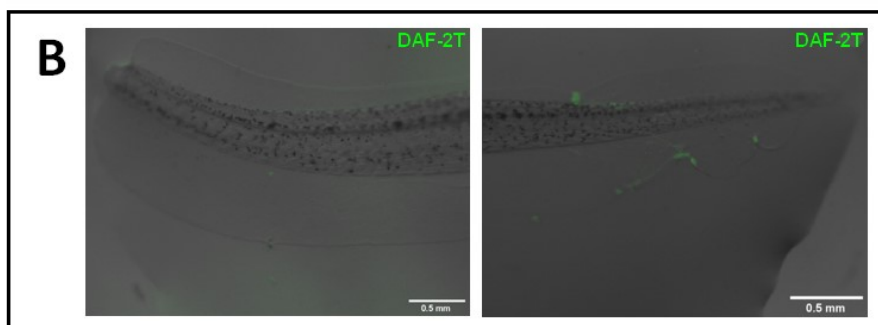
-XtiSC

Kontrolní liposom

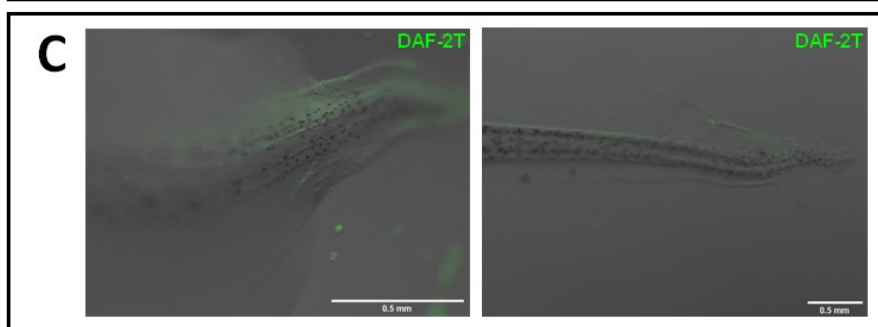
1 dpa



3 dpa



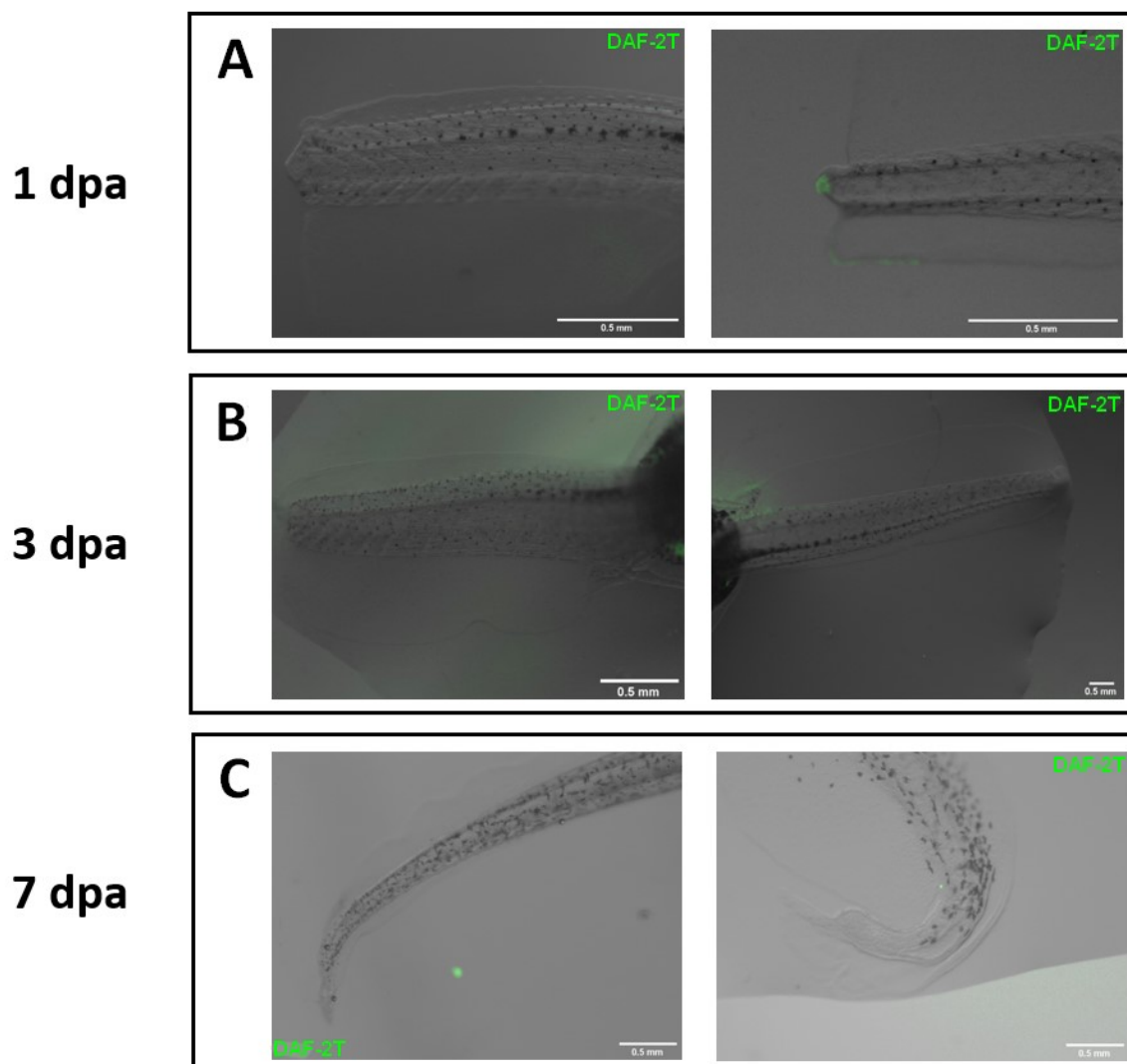
7 dpa



Obrázek 28: Zobrazení produkce oxidu dusnatého v ocasu pulce pomocí DAF-2DA sondy u skupiny injikované kontrolními liposomy 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa pořízené pomocí fluorescenční binolupy Pulci byli injikováni kontrolními liposomy, následně jim byl amputován ocas a ve dnech 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa u nich byla pozorována přítomnost oxidu dusnatého pomocí DAF-2T. (A): Reprezentativní obrázky skupiny injikované kontrolními liposomy 1 dpa, lze pozorovat silný signál oxidu dusnatého v místě amputace ocasu (B): Skupina injikovaná kontrolními liposomy 3 dpa (C): Skupina injikovaná kontrolními liposomy 7 dpa. Měřítka ukazují 0,5 mm.

-XtiSC

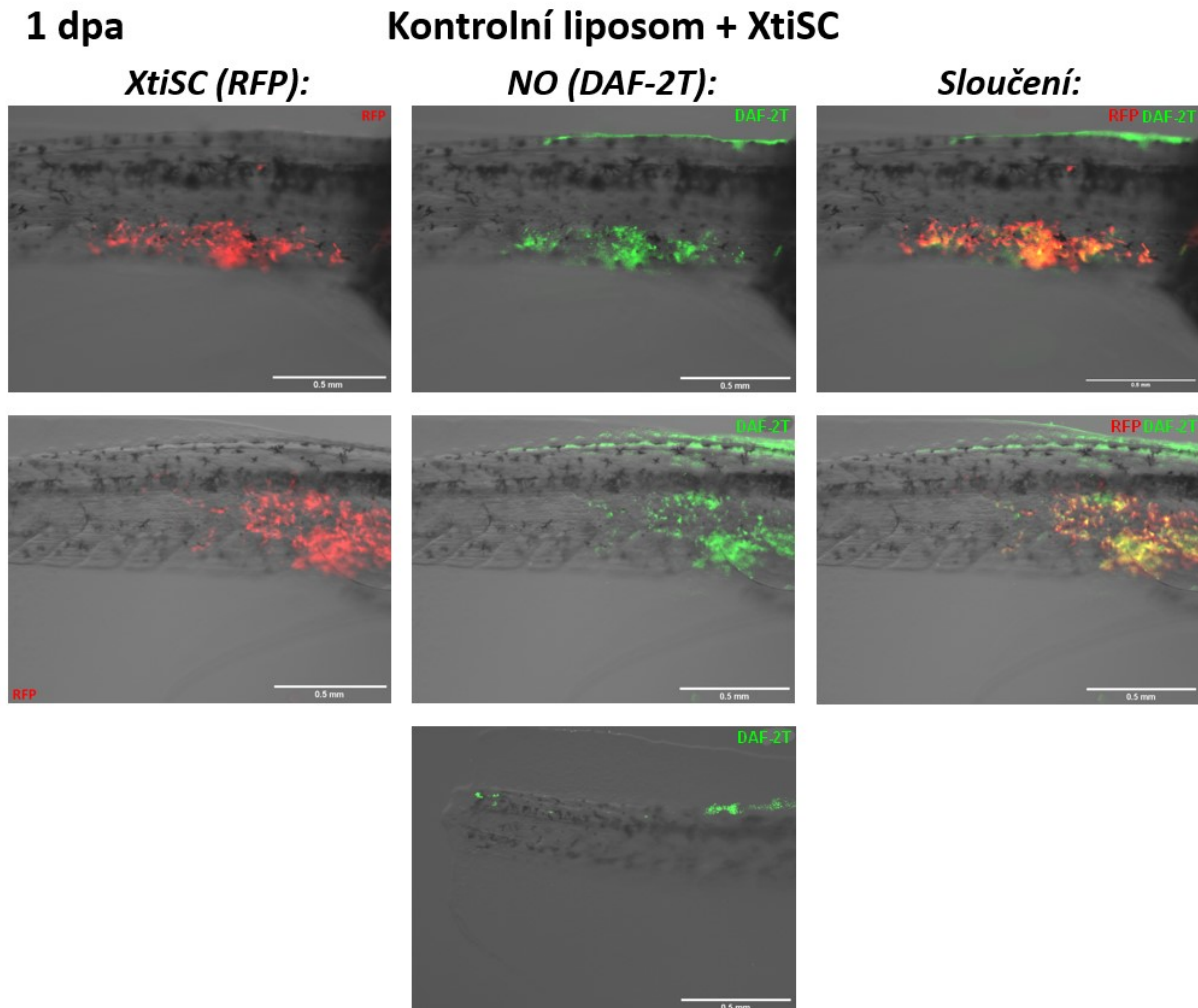
Klodrosom



Obrázek 29: Zobrazení produkce oxidu dusnatého v ocasu pulce pomocí DAF-2DA sondy u skupiny injikované klodrosomy 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa pořízené pomocí fluorescenční binolupy. Pulci byli injikováni klodrosomem, následně jim byl amputován ocas a ve dnech 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa u nich byla pozorována přítomnost oxidu dusnatého pomocí DAF-2T. (A): Skupina pulců injikována klodrosomem 1 dpa. Pulec na levém obrázku nevykazoval signál oxidu dusnatého, pulec na pravém obrázku vykazoval signál oxidu dusnatého v místě amputace ocasu, ovšem v menší míře než u skupiny kontrolního liposomu (viz obrázek č. 28) (B): Skupina pulců injikovaná klodrosomem 3 dpa. U pulců nebyl znatelný signál oxidu dusnatého (C): Skupina pulců injikována klodrosomem 7 dpa. U pulců byl zaznamenán slabý signál oxidu dusnatého. Měřítka ukazují 0,5 mm.

Při pozorování produkce oxidu dusnatého u skupin neinjikovaných XtiSC jsme zaznamenali nejsilnější signál DAF-2DA sondy pomocí fluorescenční binolupy zejména 1 den po amputaci u skupiny injikované kontrolními liposomy. V tento den byla přítomnost oxidu

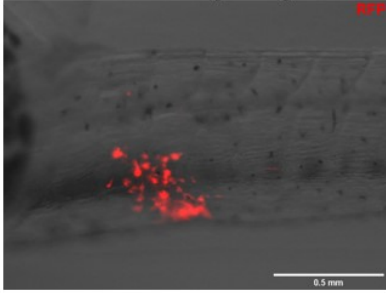
dusnatého zaznamenána v menší míře také u skupin injikovaných klodrosomy. U obou skupin byl nejsilnější signál zaznamenán zejména v místě amputace ocasu, slabější signál se dále vyskytoval náhodně po jeho celé délce.



Obrázek 30: Zobrazení produkce oxidu dusnatého a XtiSC v ocasu pulců u skupin injikovaných kontrolními liposomy a XtiSC 1 dpa pomocí fluorescenční binolupy. V prvním sloupci je patrný červený signál XtiSC, v prostředním sloupci je vidět signál oxidu dusnatého pomocí DAF-2T a vpravo pak sloučení obou barevných kanálů (merge). Na sloučených obrázcích je viditelná kolokalizace NO a XtiSC. Signál fluoresceinu je znatelný také v místě amputace ocasu. Měřítka ukazují 0,5 mm.

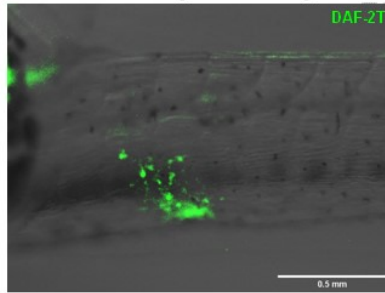
1 dpa

XtiSC (RFP):

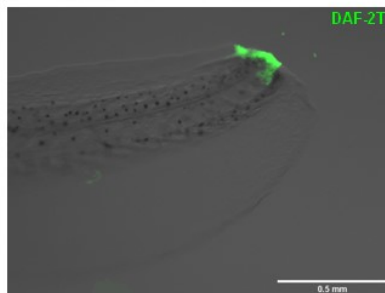
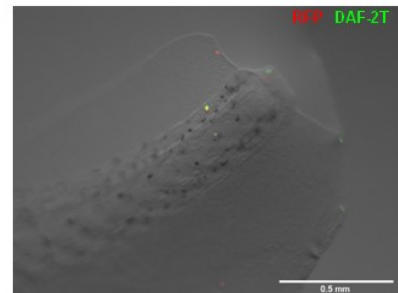
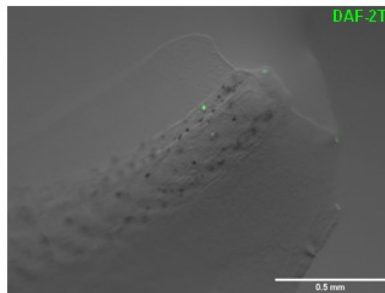
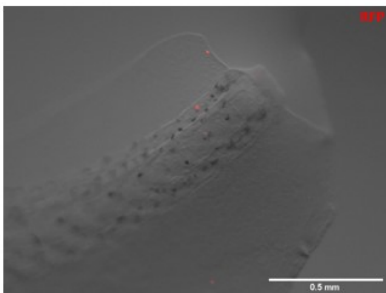
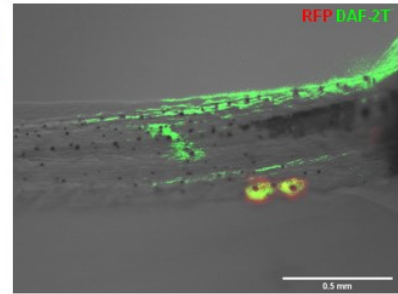
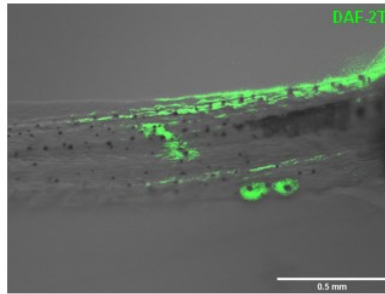
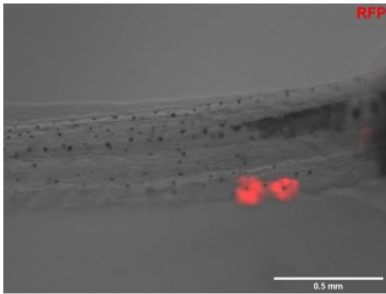
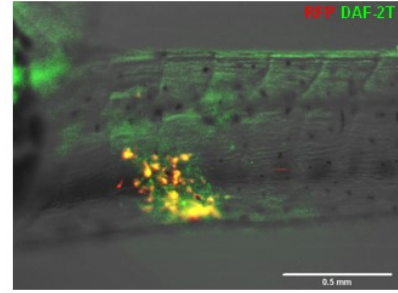


Klodrosom + XtiSC

NO (DAF-2T):



Sloučení:



Obrázek 31: Zobrazení oxidu dusnatého a XtiSC v ocasu pulců u skupin injikovaných klodrosomy a XtiSC 1 dpa pomocí fluorescenční binolupy. V prvním sloupci je patrný červený signál XtiSC, v prostředním sloupci je vidět signál oxidu dusnatého pomocí DAF-2T a vpravo pak sloučení obou barevných kanálů (merge). Na sloučených obrázcích je zřetelná kolokalizace NO a XtiSC, signál fluoresceinu je znatelný na rozsáhlejší oblasti. Na nejspodnějším obrázku je také znázorněn signál NO v místě amputace ocasu, který je přítomný i přes depleci makrofágů v pulci, což lze vysvětlit pouze částečnou deplecí makrofágů či skutečností, že NO je produkován i jinými buňkami. Měřítko ukazuje 0,5 mm.

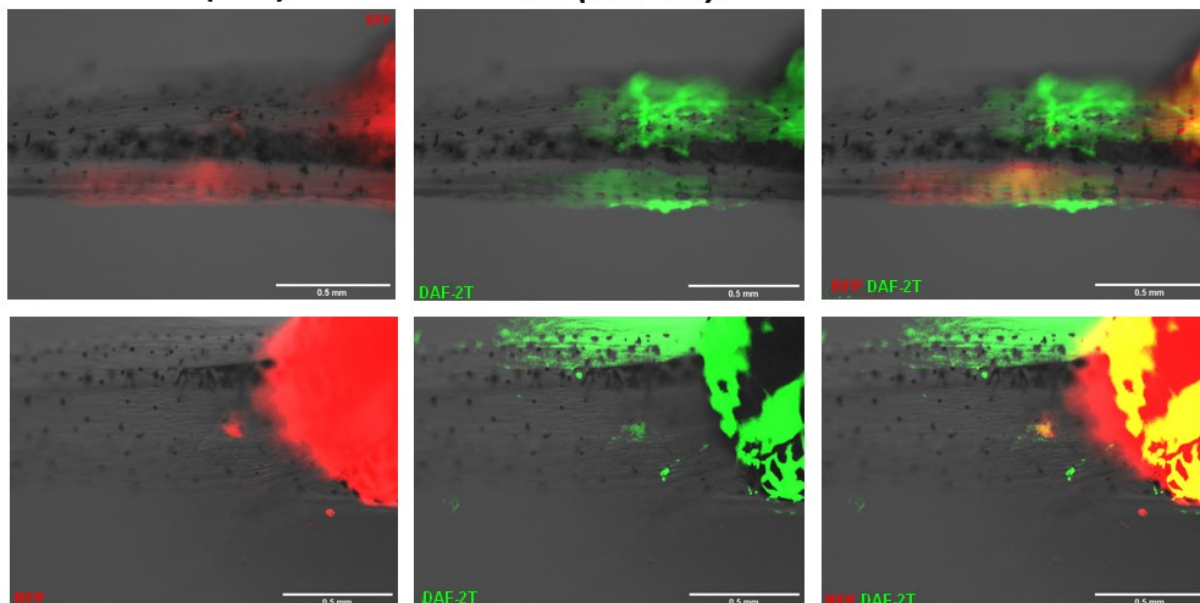
3 dpa

Kontrolní liposom + XtiSC

XtiSC (RFP):

NO (DAF-2T):

Sloučení:



Obrázek 32: Zobrazení oxidu dusnatého a XtiSC v ocasu pulců u skupin injikovaných kontrolními liposomy a XtiSC 3 dpa pomocí fluorescenční binolupy. V prvním sloupci je patrný červený signál XtiSC, v prostředním sloupci je vidět signál oxidu dusnatého DAF-2T a vpravo pak sloučení obou barevných kanálů (merge). Měřítka ukazují 0,5 mm.

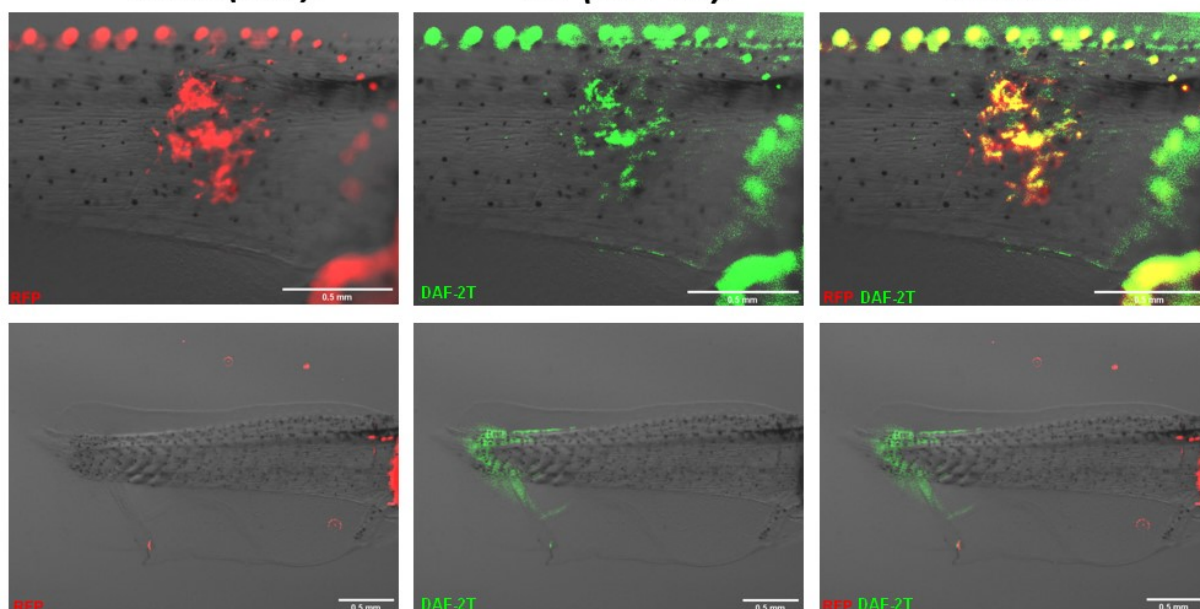
3 dpa

Klodrosom + XtiSC

XtiSC (RFP):

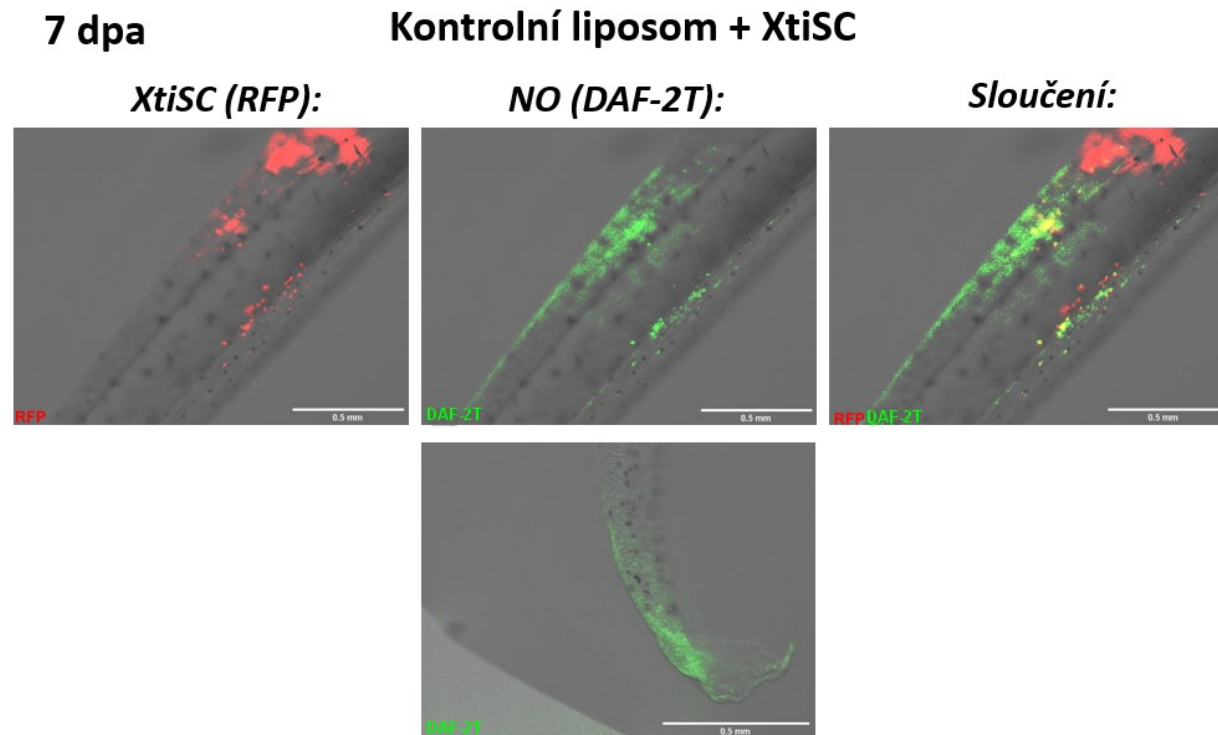
NO (DAF-2T):

Sloučení:



Obrázek 33: Zobrazení oxidu dusnatého a XtiSC v ocasu pulců u skupin injikovaných klodrosomy a XtiSC 3 dpa pomocí fluorescenční binolupy. V prvním sloupci je patrný červený

signál XtiSC, v prostředním sloupci je vidět signál oxidu dusnatého pomocí DAF-2T a vpravo pak sloučení obou barevných kanálů (merge). Měřítka ukazují 0,5 mm.



Obrázek 34: Zobrazení oxidu dusnatého a XtiSC v ocasu pulců u skupin injikovaných kontrolními liposomy a XtiSC 7 dpa pomocí fluorescenční binolupy. V prvním sloupci je patrný červený signál XtiSC, v prostředním sloupci je vidět signál oxidu dusnatého DAF-2T a vpravo pak sloučení obou barevných kanálů (merge). Měřítka ukazují 0,5 mm.

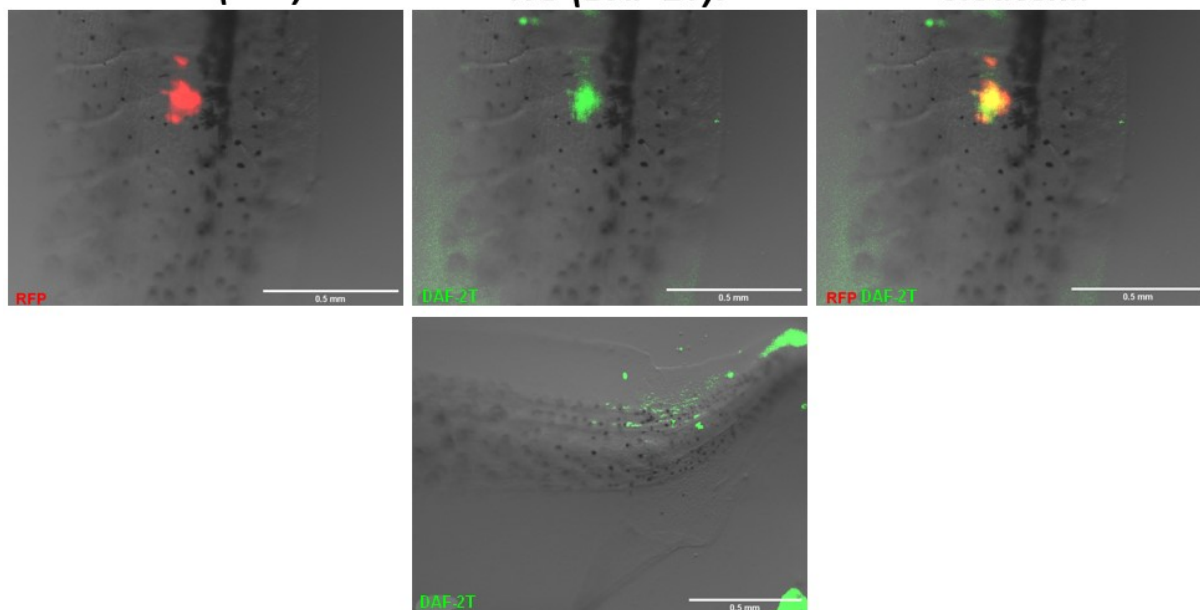
7 dpa

Klodrosom + XtiSC

XtiSC (RFP):

NO (DAF-2T):

Sloučení:



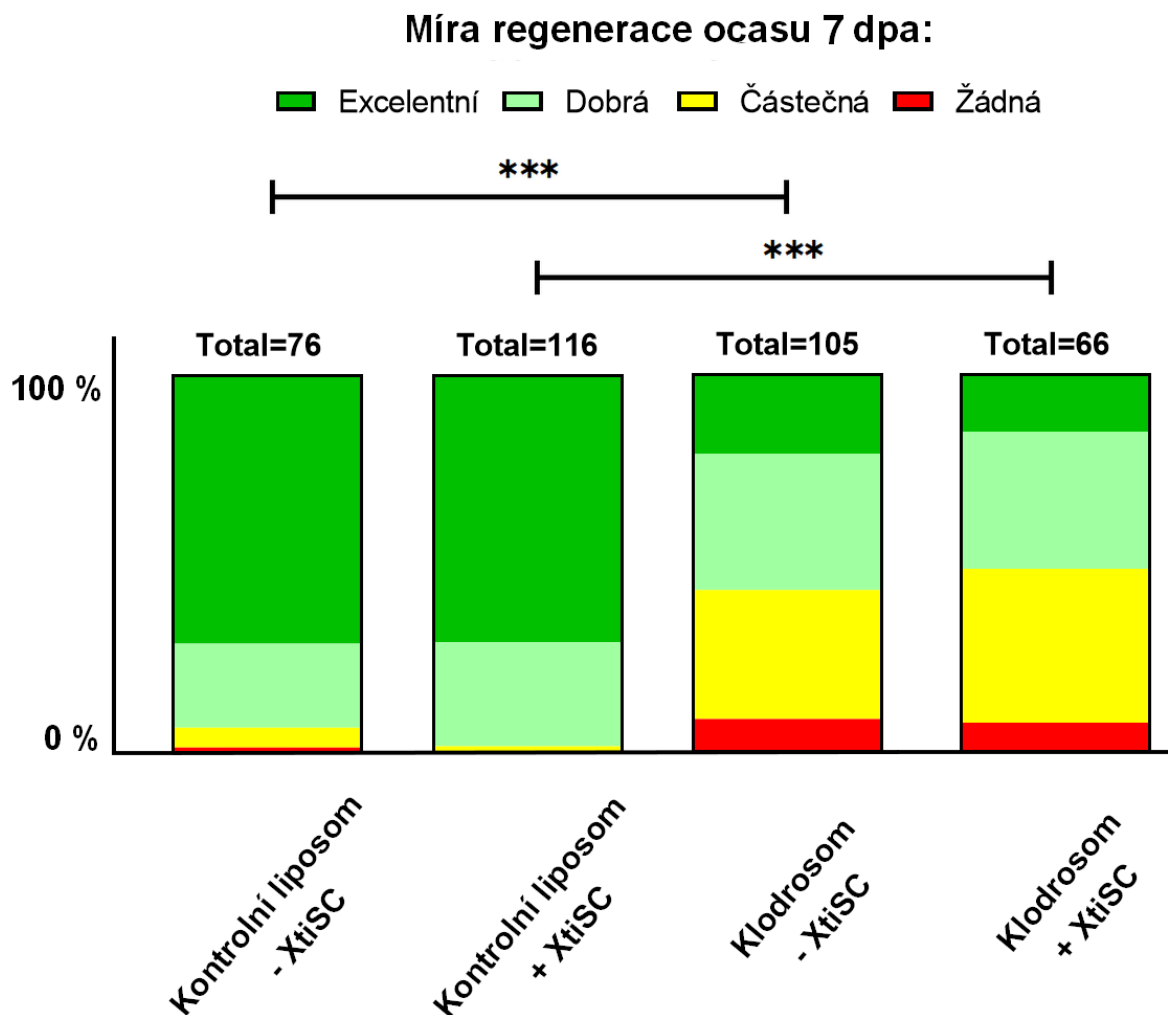
Obrázek 35: Zobrazení oxidu dusnatého a XtiSC v ocasu pulců u skupin injikovaných klodrosomy a XtiSC 7 dpa pomocí fluorescenční binolupy. V prvním sloupci je patrný červený signál XtiSC, v prostředním sloupci je vidět signál oxidu dusnatého DAF-2T a vpravo pak sloučení obou barevných kanálů (merge). Měřítka ukazují 0,5 mm.

Přítomnost oxidu dusnatého jsme sledovali také u skupin injikovaných buněčnou kulturou XtiSC. V předešlé diplomové práci vypracované pod vedením školitele (Wróblová, 2020) byla pomocí Lighsheet mikroskopie a následné analýzy obrazu v ImageJ prokázána až 95 % kolokalizace RFP signálu XtiSC a zeleného fluorescenčního signálu indikátoru oxidu dusnatého DAF-2DA. Pro potvrzení těchto výsledků jsme pozorovali kolokalizaci XtiSC a oxidu dusnatého u skupin injikovaných kontrolními liposomy či klodrosomy ve dnech 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa. U všech tří experimentálních skupin byla opět potvrzena kolokalizace obou fluorescenčních signálů.

6.3. Studium míry regenerace u experimentálních skupin pulců *X. tropicalis* po amputaci ocasu

Vždy týden po amputaci ocasu jsme pozorovali míru regenerace ocasu pulců u všech 4 experimentálních skupin. Regeneraci jsme hodnotili jako excelentní, dobrou, částečnou a žádnou. Při porovnání míry regenerace oproti očekávané (kdy jako očekávaná sloužila skupina kontrolního liposomu) bylo zpozorováno statisticky signifikantní zhoršení regenerace u skupin klodrosomu s depletovanými makrofágy, a to jak u skupin s injikovanými XtiSC, tak bez této

injekce. Injekce XtiSC u pulců nevedla jak u skupiny kontrolního liposomu, tak klodrosomu ke zlepšení regenerace ocasu.



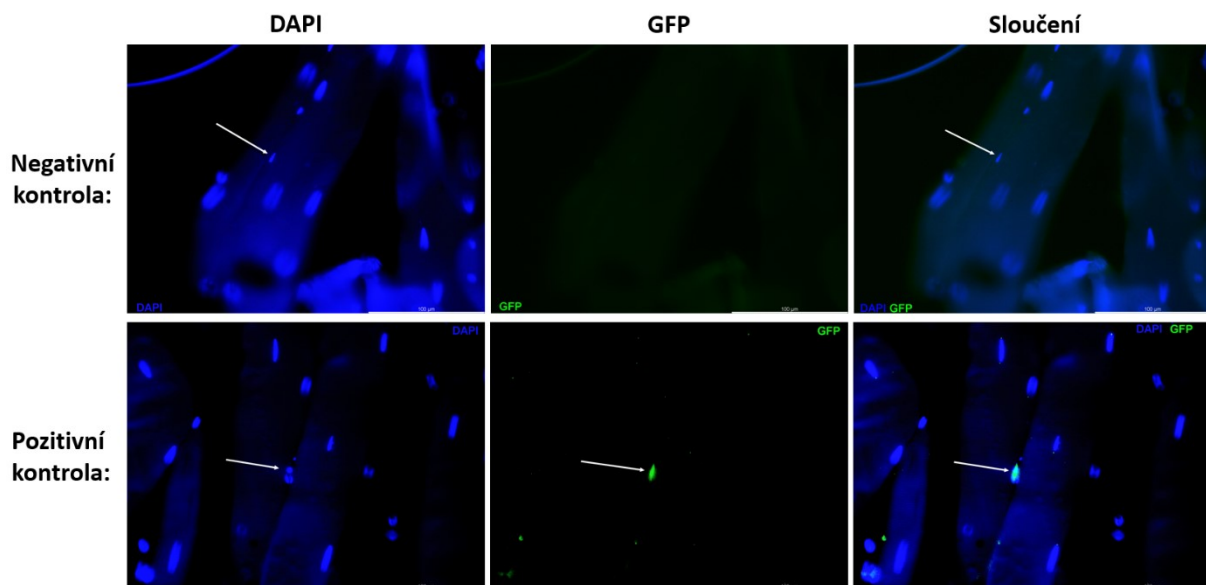
Obrázek 36: Míra regenerace ocasu u experimentálních skupin pulců 7 dpa. Skupiny klodronátu regerovali v menší míře než skupiny kontrolního liposomu, a to jak po injekci XtiSC tak bez její injekce ($P < 0,001$). Po injekci XtiSC nedošlo ke statisticky významnému zlepšení míry regenerace u skupiny kontrolního liposomu i klodrosomu. Pro vyhodnocení dat byl použit Chí-kvadrát test porovnávající očekávanou distribuci od pozorované, jako očekávaná distribuce sloužily skupiny kontrolního liposomu.

6.4. Studium vlivu makrofágů a XtiSC na počty satelitních buněk po amputaci ocasu u pulců *X. tropicalis*

Klíčovou roli v regeneraci svalu hrají satelitní buňky, jejichž typickým markerem je protein Pax7. Typicky se vyskytují v quiescentním stavu vmezeřené mezi svalovými vlákny a v reakci na poranění jsou aktivovány a znovu vstupují do buněčného cyklu. Po proliferaci fúzí se svalovými vlákny, čímž podporují obnovu svalu.

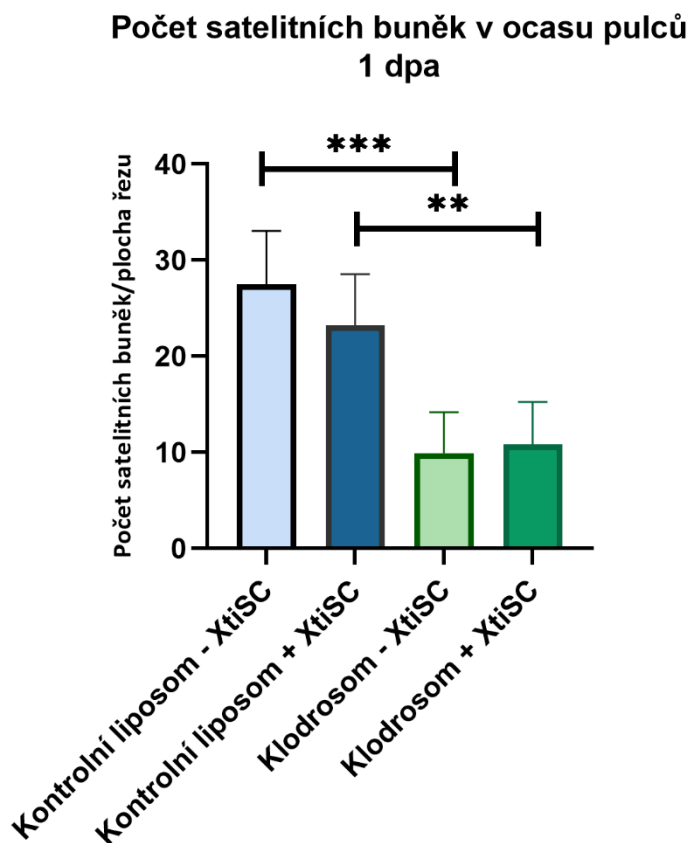
Pro studium vlivu makrofágů a XtiSC na počty satelitních buněk po amputaci ocasu u pulců *X. tropicalis* jsme zaznamenávali množství satelitních buněk u experimentálních skupin 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa. V každé skupině se vyskytovalo nejméně 5 pulců. Z každého pulce byly vyhotoveny řezy na kryomikrotomu, které byly následně imunofluorescenčně barveny a snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Pro následnou analýzu byl zjištěn počet satelitních buněk v ocasu každého pulce, který byl vydělen součtem plochy analyzovaných řezů. Pro vyhodnocení plochy řezů byl použit program ImageJ.

Abychom zajistili věrohodnost výsledků, provedli jsme kontrolní barvení nově pořízené Pax7 primární protilátky. Barvení bylo provedeno na kosterním svalu dospělé *X. tropicalis*. Jako negativní kontrola sloužil vzorek, který nebyl inkubován v primární protilátce, ale pouze v protilátce sekundární. Oproti tomu jsme vytvořili vzorek pozitivní kontroly, který byl inkubován jak v primární, tak následně v sekundární protilátce. Jelikož pozitivní kontrola vykazovala zelený signál satelitních buněk a negativní kontrola nikoliv, barvení lze považovat za úspěšné (viz obrázek č. 37).



Obrázek 37: Kontrolní barvení primární Pax7 protilátky na kosterním svalu dospělé *X. tropicalis* Pro zobrazení satelitních buněk jsme provedli kontrolu nově pořízené protilátky od Novus Biologicals. V horní řadě je zobrazena negativní kontrola, při které nebyla použita Pax7 primární protilátka, ale pouze sekundární protilátka. Spodní řada zobrazuje pozitivní kontrolu, při které byla využita Pax7 primární protilátka v koncentraci 1:500. Šipky ukazují na satelitní buňky vmezežené mezi svalovými vlákny. Měřítka ukazují 100 μ m.

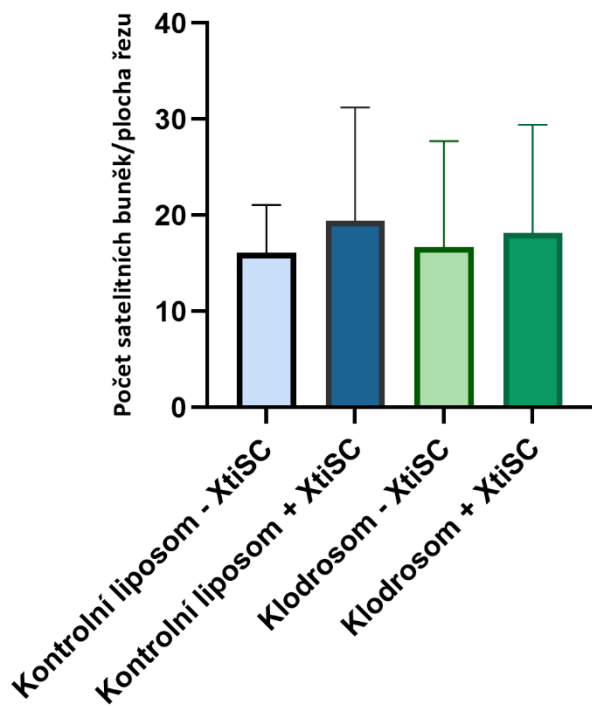
Při studiu, jak deplece makrofágů ovlivňuje počty satelitních buněk v ocasu pulců bylo zaznamenáno signifikantní snížení počtu satelitních buněk pouze u pulců 1 dpa, a to u jak po injekci XtiSC tak bez této injekce (viz obrázek č. 38) ($P < 0,001$ u skupiny bez injekce XtiSC, $P < 0,002$ u skupiny s injikovanými XtiSC). 3 dpa a 7 dpa nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi kontrolními skupinami a skupinami injikovanými klodrosomy.



Obrázek 38: Počet satelitních buněk v ocasu pulců 1 dpa. 1 dpa došlo v jako jediný pozorovaný den k signifikantnímu snížení počtu satelitních buněk po depleci makrofágů jak u skupiny bez injekce XtiSC ($P < 0,001$), tak s injekcí XtiSC ($P < 0,002$). Pro vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test (* značí $P < 0,033$, ** značí $P < 0,002$, *** značí $P < 0,001$).

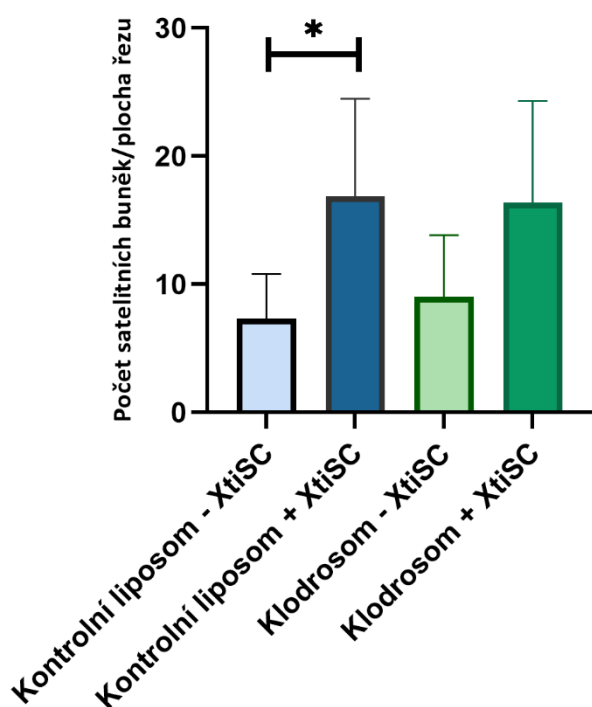
3 dpa byl u všech experimentálních skupin zaznamenán poměrně stejný počet satelitních buněk, zato 7 dpa došlo po injekci XtiSC u skupiny kontrolního liposomu k signifikantnímu nárůstu počtu satelitních buněk.

Počet satelitních buněk v ocasu pulců 3 dpa



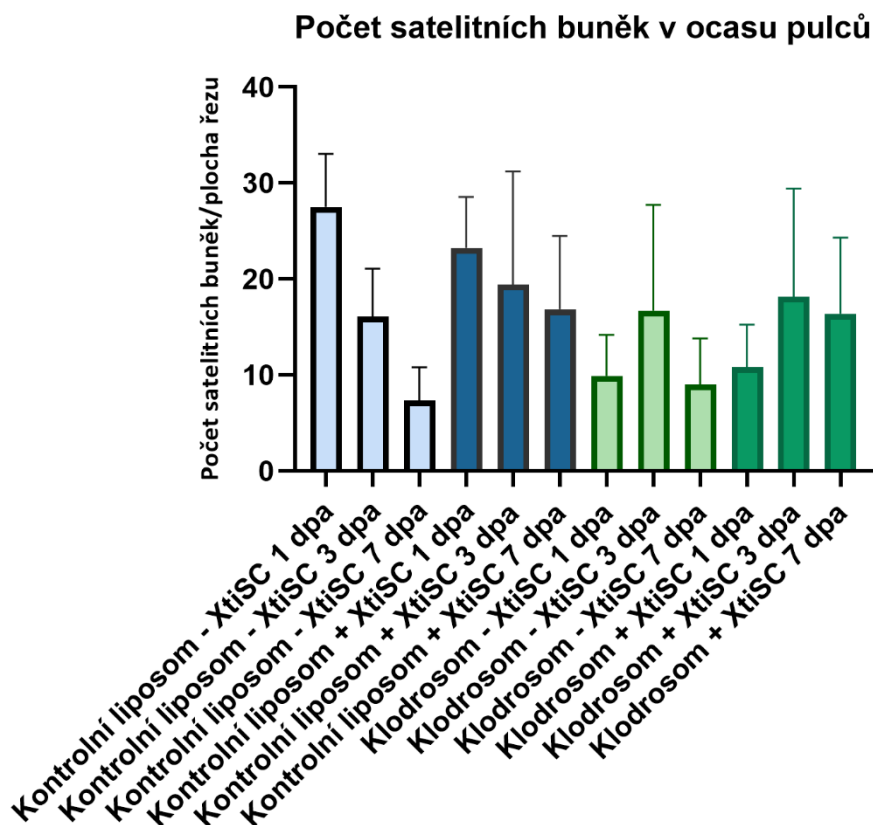
Obrázek 39: Počet satelitních buněk v ocasu pulců 3 dpa. 3 dpa nedošlo mezi experimentálními skupinami k žádnému statistickému rozdílu v počtu satelitních buněk. Pro vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test (* značí $P < 0,033$, ** značí $P < 0,002$, *** značí $P < 0,001$).

Počet satelitních buněk v ocasu pulců 7 dpa



Obrázek 40: Počet satelitních buněk v ocasu pulců 7 dpa. U skupiny kontrolního liposomu došlo díky injekci XtiSC k významnému nárůstu počtu satelitních buněk. Pro vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test (* značí $P < 0,033$, ** značí $P < 0,002$, *** značí $P < 0,001$).

Pro lepší pozorování změn počtu satelitních buněk v čase jsem vytvořila graf zahrnující výsledné počty všech pozorovaných dnů (viz obrázek č. 41). U skupin kontrolního liposomu bylo maximum satelitních buněk zaznamenáno 1 dpa. Tato skutečnost odpovídá fyziologickým procesům, kdy se po poranění tkáně satelitní buňky aktivují a vstupují do buněčného cyklu. V následujících dnech satelitní buňky diferencují v progenitory myogenní linie a jejich počet v tkáni se tedy snižuje na původní hodnotu, což koreluje s pozorovaným snížením satelitních buněk 3 dpa a 7 dpa. Deplece makrofágů injekcí klodrosomů zapříčinila pokles satelitních buněk oproti skupinám kontrolního liposomu 1 dpa a injekce XtiSC naopak způsobila nárůst satelitních buněk 7 dpa u skupiny kontrolního liposomu.



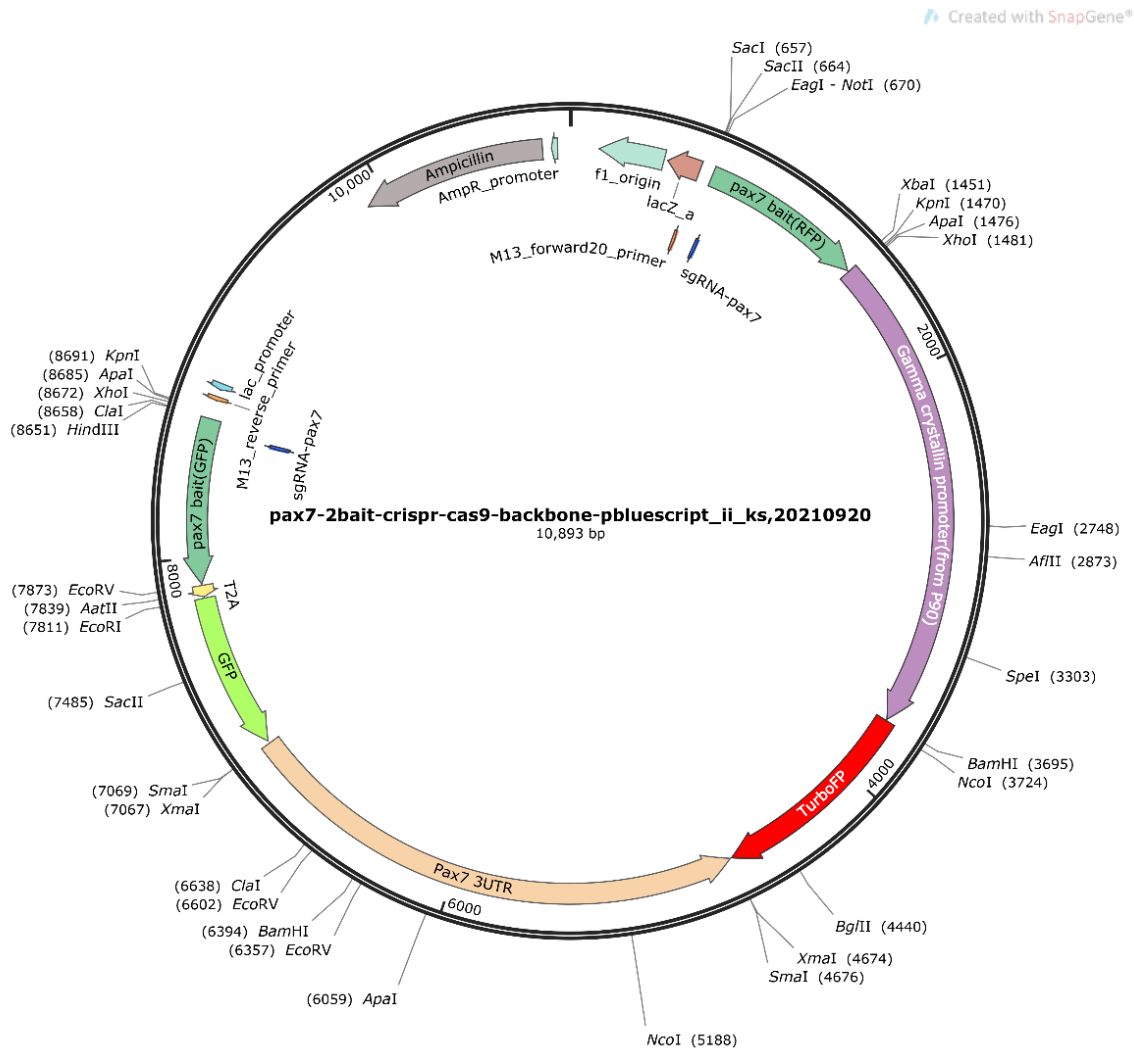
Obrázek 41: Počet satelitních buněk v ocasech pulců ve všechny pozorované dny.

6.5. Vytvoření vektoru exprimujícího EGFP pod Pax7 promotorem pro *in vivo* vizualizaci satelitních buněk

Pro usnadnění pozorování satelitních buněk v budoucích studiích jsme se rozhodli vytvořit vektor exprimující EGFP pod Pax7 promotorem, což je marker satelitních buněk. Vektor je navržený pro inzerci do posledního intronu Pax7 genu. Inzerci do intronu jsme zvolili díky minimální úpravě intronových sekvencí, což zamezí nechtěným reparacím genomu po vložení našeho konstruktů. Pro vložení konstruktů do genomu jsme se rozhodli použít metodu CRISPR-Cas9, využívající gRNA, která navádí Cas9 nukleázu k místu štěpení. Při správném vložení vektoru je přepisována GFP sekvence pocházející z námi vytvořeného vektoru. EGFP je přepisováno díky jeho downstream umístění pod Pax7 promotorem, který je přítomný v satelitních buňkách *X. tropicalis*. Pro zabránění vytvoření polyproteinu Pax7-EGFP, což by mohlo vést k ovlivnění funkce Pax7 proteinu, jsme před EGFP sekvencí vložili samoštěpící T2A peptid, jehož štěpení funguje na principu předčasné ukončení translace znemožněním vytvoření peptidové vazby ribozomem (tzv. mechanismem ribosome skipping). Pro ukončení translace po přepisu Pax7 a EGFP sekvence jsme za EGFP sekvencí vložili Pax7 3' UTR.

Na základě větší úspěšnosti vložení inzertu s využitím 2-bait systému (Mao a kol., 2018) oproti 1-bait systému jsme sestavili vektor se dvěma komplementárními sekvencemi ke gRNA (na obrázku č. 42 zobrazeny jako Pax7 bait). Tento systém má výhodu především v inzerci pouze chtěné sekvence umístěné mezi bait sekvencemi bez inzerce ostatních sekvencí, které by mohli interferovat s výsledky (např. sekvence ampicilinové rezistence pod jejím promotorem, která sloužila pro selekci vektoru).

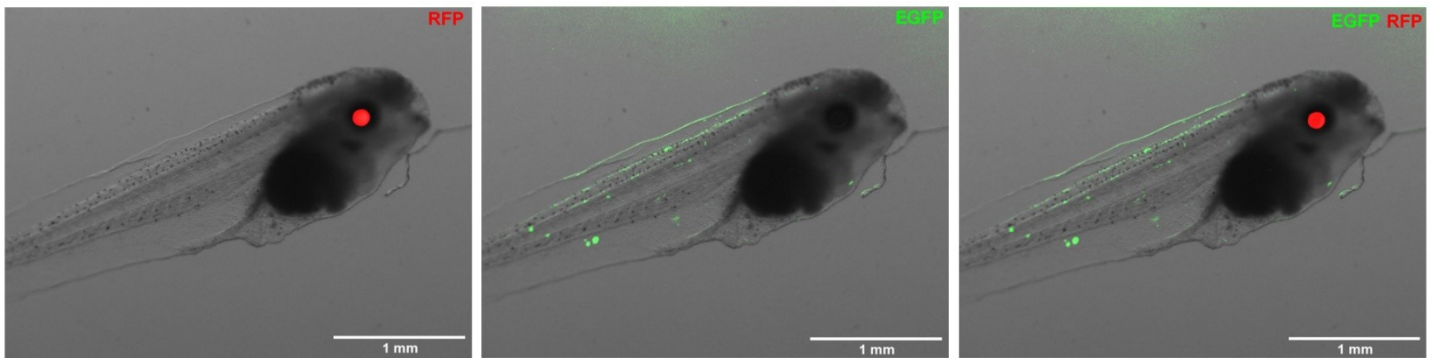
Jako reportérový gen značící integraci vektoru do genomu *X. tropicalis* jsme zvolili RFP exprimovaný pod γ -krystalinovým promotorem, což je promotom silně exprimovaný v čočce obratlovců. RFP je tedy exprimováno při jakékoliv integraci vektoru, nutno zmínit, že vektor může být integrován i v opačné orientaci, ve které není EGFP pod Pax7 promotorem exprimováno. I v tomto případě dochází ovšem k expresi RFP pod γ -krystalinovým promotorem, což vytváří červený fluorescenční signál v očích pulce. Vektor může být také integrován v pozdějším než chtěném 1 buněčném stádiu, přičemž vznikne tzv. mozaika, kdy je vektor integrován pouze v části buněk organismu. Tyto mozaiky mohou vykazovat RFP signál v obou očích, či pouze v 1 oku. Pro vytvoření transgenní linie je ovšem nutné, aby byla sekvence vektoru integrována i v gametách.



Obrázek 42: Vektor exprimující EGFP pod Pax7 promotorem pro in vivo vizualizaci satelitních buněk (obrázek byl vytvořen mou kolegyní Zhao Qing, Msc. pomocí SnapGene).

Za dobu vypracování této diplomové práce jsme provedli celkem 7 mikroinjekcí, při kterých kladly oocyty 3-4 samice a byli obětováni 2 samci. Při každé mikroinjekci proběhla 4 opakování oplození, kdy byla použita všechna odebraná varlata *X. tropicalis* (celkem tedy 28 mikroinjekcí). Za tuto dobu jsme zaznamenali RFP signál v obou očích u 16 pulců, RFP signál v 1 oku u 5 pulců a RFP signál společně s EGFP signálem u 22 pulců. RFP i EGFP signál v prvotních injekcích nebyl trvalý a po čase již nebyl viditelný. Bylo tedy pravděpodobné, že nedošlo k integraci vektoru do genomu a vektor se v buňkách vyskytoval pouze ve formě epizomu, který byl postupně odstraněn.

Při posledních mikroinjekcích se podařilo získat celkem 13 pulců s RFP signálem v čočce i EGFP signálem, který je znatelný i po týdnu pozorování.



Obrázek 43: Transgenní pulec exprimující námi vytvořený vektor pro *in vivo* vizualizaci satelitních buněk. Na levém obrázku je znázorněno RFP v čočce pulce exprimované pod γ -krystalinovým promotorem. Na prostředním obrázku je znázorněno EGFP exprimované pod Pax7 promotorem a vpravo je vytvořeno sloučení předchozích dvou obrázků (*merge*). Měřítka ukazují 1 mm.

7. Diskuze

Zánětlivé prostředí svým dlouhodobým působením zabraňuje efektivní regeneraci tkáně. (Ren a Young, 2013; Godwin a Rosenthal, 2014; Gawriluk a kol., 2020). Živočichové se schopností kompletní regenerace (např. řád ocasatých) jsou schopni účinně potlačit zánětlivou fázi, zatímco živočichové s omezenější regenerací (např. řád žab) ji mají prodlouženou, což zapříčiňuje špatné přeskupení extracelulární matrix a vznik jizvy (Godwin a Rosenthal, 2014). Potlačení zánětlivé fáze navíc vedlo u živočichů s omezenou schopností regenerace k větší míře obnovy poškozené tkáně (Ren a Young, 2013). Navýšení zánětlivých procesů u *X. tropicalis* mělo také za následek sníženou migraci ROC do místa poranění, které jsou běžně přítomné v epidermis a v reakci na amputaci ocasu migrují do místa poranění. Zde podporují navýšení množství progenitorů sekrecí ligandů, které indukují jejich proliferaci (Aztekin a kol., 2020).

Za vytvoření zánětlivého prostředí jsou u žab rodu *Xenopus* zodpovědné M1 makrofágy, přítomné v poškozené tkáni první 2 dny (St. Pierre a Tidball, 1994). Jejich funkcí je především sekrece zánětlivých cytokinů, čímž zvyšují míru apoptotických procesů nezbytných pro přeskupení tkáně a aktivují proliferaci satelitních buněk (Dort a kol., 2019). Vyznačují se také expresí iNOS, která zajišťuje produkci oxidu dusnatého do okolí, u kterého byla prokázána jeho jak zánětlivá, tak regenerativní stimulace (Grayfer a kol., 2018). Následně v tkáni převládají regenerativní M2 makrofágy, které podněcují diferenciaci satelitních buněk ve svalová vlákna a vylučují do tkáně protizánětlivé cytokiny (Dort a kol., 2019). Přítomnost M1 makrofágů je zajišťována Th1 cytokiny (IFN γ , TNF- α) (Pace a kol., 1983; Philip a Epstein, 1986), zatímco diferenciaci v M2 makrofágy Th2 cytokiny (IL-4, IL-10, IL-13) (Abrams a kol., 1991; Mills a kol., 2000)

Velmi slibným kandidátem, který je schopen vytvořit protizánětlivé prostředí jsou Sertoliho buňky, které sekrecí imunoregulačních faktorů podněcují diferenciaci zánětlivých M1 makrofágů v regenerativní M2 (Porubská a kol., 2021). Kromě parakrinního ovlivnění sousedních buněk jsou Sertoliho buňky schopné podpory funkce T buněk či makrofágů vytvořením tubulárních kanálků, kterými jsou schopny jim předávat mitochondrie. Ty mohou následně ovlivnit jejich metabolismus a fenotyp.

Jako velmi nadějná se jeví také více studovaná terapie s využitím MSC, které svým působením také potlačují expresi M1 makrofágů a vytvářejí prostředí vhodné pro expresi M2 makrofágů, ovšem méně účinně, než Sertoliho buňky (Ren a kol., 2008; Porubská a kol., 2021). Mezi další příhodné vlastnosti MSC patří schopnost snížit množství exprese prozánětlivých cytokinů a neutrofilů (Danchuk et al. 2011) a produkce protizánětlivých IL-10, TGF- β a iNOS (Maria a kol., 2018; Liu a kol., 2019). Především iNOS produkcí oxidu dusnatého inhibuje T buňky a podněcuje diferenciaci M1 makrofágů na M2 makrofágy (Sato a kol., 2007; Lu a kol., 2015).

Buněčná kultura progenitorů Sertoliho buněk a peritubulárních myoidních buněk XtiSC založená v laboratoři školitele vykazuje podobné vlastnosti jako MSC, jmenovitě několik pluripotentních povrchových markerů, schopnost migrace k místu poranění a diferenciaci v chondrocyty, osteocyty a adipocyty (Tlapáková a kol., 2016).

Na základě těchto skutečností jsme se rozhodli zjistit, zda naše buněčná kultura XtiSC vykazuje podobné protizánětlivé vlastnosti jako Sertoliho buňky a MSC. Pro ověření hypotézy, zda XtiSC spoluprací s makrofágy ovlivňují regeneraci či dokonce dokáží plně nahradit funkci makrofágů při jejich absenci jsme vytvořili 4 experimentální skupiny zahrnující skupiny s deplecí makrofágů pomocí klodrosomů a skupiny injikované XtiSC. Jako kontrolní skupiny injekce klodrosomy sloužili pulci mikroinjikovaní kontrolními liposomy a jako kontrolní skupiny injekce XtiSC sloužili pulci bez injekce XtiSC.

Injekce klodrosomů do krevního oběhu pulců zapříčinila účinnou depleci makrofágů ve všechny 3 pozorované dny (1 dpa, 3 dpa a 7 dpa). Počet makrofágů se u všech skupin bez injekce XtiSC udržoval na poměrně stejné hladině, oproti tomu u skupin injikovaných XtiSC se počet makrofágů postupně zvyšoval se zaznamenáním jejich maxima 7 dpa. Tento výsledek prokazuje imunomodulační schopnost XtiSC navýšením počtů makrofágů v ocasu pulce.

Pro podrobnější pochopení, zda XtiSC vykazují podobné protizánětlivé vlastnosti jako MSC podpořením diferenciaci M1 makrofágů na M2 makrofágy či sekrecí protizánětlivých molekul bude možným budoucím objektem výzkumu naší laboratoře porovnání množství M1 a M2 makrofágů v ocasu pulců *X. tropicalis* po amputaci ocasu ve skupinách s injikovanými XtiSC a bez jejich injekce.

XtiSC po transplantaci do pulce vytváří v místě vpichu niku, ve které se dále množí a vylučují do okolí oxid dusnatý a potenciální další faktory (Wróblová, 2020). Oxid dusnatý je v procesu regenerace produkován především v počátečních fázích a je nezbytný pro expresi genů řídících její náležitý průběh (Abaffy a kol., 2019). Ve vysokých koncentracích, kdy je oxid dusnatý produkován v odpovědi na poranění M1 makrofágy prostřednictvím iNOS, zastává antibakteriální zánětlivou funkci a podporuje apoptózu (Rigamonti a kol., 2013). Oxid dusnatý dokáže reagovat s oxidovými radikály za vzniku reaktivních sloučenin dusíku (reactive nitrogen species, RNS), které způsobují oxidaci lipidů, proteinů a DNA (Brüne a kol., 2013). Svou roli má ovšem také v pozdější fázi regenerace, kdy ovlivňuje správné přeskupení tkáně (Abaffy a kol., 2019).

Produkcí oxidu dusnatého jsme pozorovali vždy 1 dpa, 3 dpa a 7 dpa pomocí DAF-2DA sondy u námi definovaných 4 experimentálních skupin. V souladu s literaturou jsme při detekci oxidu dusnatého zaznamenali jeho největší produkci v místě amputace 1 dpa (Ronco a kol., 2004; Franchini a Bertolotti, 2011; Lu a kol., 2015). Jelikož je oxid dusnatý v zánětlivé fázi regenerace produkován především M1 makrofágy, měli bychom u skupiny injikované klodrosomy a tedy s deplecí makrofágů zaznamenat menší signál oxidu dusnatého, než u skupiny injikované kontrolními liposomy. Tato teorie se v praxi částečně potvrdila, ovšem i u skupiny klodrosomu byl zaznamenán nepatrný signál oxidu dusnatého 1 dpa.

Přítomnost oxidu dusnatého u skupin injikovaných klodrosomy může způsobena například faktem, že injekce klodrosomů nevede k naprosté depleci makrofágů, pouze k depleci jejich většiny, či skutečností, že makrofágy nejsou jediným producentem NO syntáz v obnovované tkáni (dalšími producenty jsou například svalová tkáň a endotel cév [Sessas a kol., 1992; Punkt a kol., 2002])

Produkcí oxidu dusnatého jsme zaznamenávali také u skupin injikovaných naší buněčnou kulturou XtiSC. Při tomto pozorování se nám potvrdila kolokalizace XtiSC a fluorescenčního signálu oxidu dusnatého ve všechny 3 pozorované dny. Signál oxidu dusnatého byl přítomen také v místě amputace či v jeho blízkosti.

Oxid dusnatý slouží jako chemoatraktant u mnohých buněčných typů (př. MSC, keratinocytů a dalších) (Zhan a kol., 2015; Fuseler a Valarmathi, 2016; Zhan a kol., 2016). Na

základě tohoto faktu byla vytvořena hypotéza, že oxid dusnatý slouží jako chemoatraktant k místu poranění také pro XtiSC.

Pro otestování výše zmíněné hypotézy byla v předchozí diplomové práci vypracované pod vedením školitele (Wróblová, 2020) pozorována migrace XtiSC do místa poranění u pulců s vyřazenou funkcí endoteliálních a neurálních NO syntáz (eNOS a nNOS), které jsou producenty oxidu dusnatého a u kontrolních pulců s jejich nevyřazenou funkcí. U pulců s vyřazenou funkcí NO syntáz se prokázala zhoršená migrace do místa amputace (úspěšnost migrace 40,63 %) oproti kontrolním pulcům (úspěšnost migrace 65,75 %). Tyto výsledky tedy potvrdily hypotézu, že oxid dusnatý slouží pro XtiSC jako chemoatraktant k místu amputace.

Jelikož jedněmi z hlavních producentů oxidu dusnatého v regenerující tkáni jsou M1 makrofágy (Lu a kol., 2015), rozhodli jsme se v návaznosti na předchozí výzkum prostudovat migrační schopnosti XtiSC v přítomnosti makrofágů a po jejich depleci injekcí klodrosomů. Buněčná kultura XtiSC zůstávala v místě původní injekce u skupiny injikované klodrosomy signifikantně více (87,85%) ($P < 0,001$), než u kontrolní skupiny injikované prázdnými liposomy (56,25 %). U kontrolní skupiny injikované prázdnými liposomy byla naopak zaznamenána větší migrace k místu poranění (celkově 43,75 %), než u skupiny injikované klodrosomy (celkově 12,4 %). Tento výsledek potvrzuje naši hypotézu, že makrofágy jsou důležitým faktorem pro migrační schopnost XtiSC k místu amputace ocasu, a to buď produkcí oxidu dusnatého či jinými dosud neznámými mechanismy.

Pro další studium, jaký efekt má deplece makrofágů na regeneraci ocasu a zda injekce XtiSC zlepšuje tento proces či alespoň nahrazuje funkci makrofágů, jsme u experimentálních skupin pozorovali vždy týden po amputaci ocasu jeho celkovou morfologii. Možný pozitivní efekt XtiSC na regeneraci podporuje nedávná studie, ve které injekce prasečích mikroenkapsulovaných Sertoliho buněk do peritonea myši s delecí v genu pro protein dystrofin vedla k indukci produkce utrofinu, který je dystrofinovým paralogem (Chiappalupi a kol., 2017).

Míra regenerace ocasu byla hodnocena jako excelentní, dobrá, částečná a žádná. Při depleci makrofágů došlo jak u skupiny bez injekce XtiSC, tak u skupiny s injekcí XtiSC k signifikantnímu zhoršení obnovy ocasu oproti kontrolní skupině injikované prázdnými liposomy. Tato skutečnost opět potvrzuje nezbytnou roli makrofágů při korektní obnově

ocasů, hlavně v počátečních fázích po jeho amputaci. Je také otázkou, zda injekce klodrosomů vede pouze k depleci makrofágů, či i jiných pro regeneraci klíčových buněk (např. ROC), čímž je zhoršena celková schopnost obnovy ocasu.

Injekce XtiSC nevedla ke zlepšení celkového vzhledu morfologie ocasu ani u skupiny kontrolního liposomu ani u skupiny po injekci klodrosomů. Na druhou stranu je pro tento proces zapotřebí také regenerace pokožky, míchy, mezibuněčné hmoty a vaskulatury.

Posledním pozorovaným faktorem, který byl pro lepší pochopení vlivu makrofágů a XtiSC na regeneraci ocasu zkoumán, byly počty satelitních buněk v ocasech pulců v námi definovaných experimentálních skupinách. Satelitní buňky se běžně vyskytují vmezeřené mezi svalovými vlákny v quiescentním stavu. Po poranění tkáně jsou aktivovány a zahajují proliferaci. Následně diferencují v progenitory myogenní linie, které tvoří myofibrily a svalová vlákna (Schultz a kol., 1985; Seale a kol., 2000). V nedávné studii bylo potvrzeno navýšení proliferace a diferenciací myoblastů pomocí Sertoliho buněk (Salvadori a kol., 2021), lze tedy očekávat, že by XtiSC měly vykazovat podobné pro regeneraci prospěšné vlastnosti.

Deplece makrofágů pomocí klodrosomů způsobila statisticky signifikantní snížení satelitních buněk u pulců pouze 1 dpa ($P < 0,001$ u skupiny bez injekce XtiSC, $P < 0,002$ u skupiny s injikovanými XtiSC). Jedním z vysvětlení tohoto snížení je skutečnost, že v raných fázích regenerace ocasu podporují proliferaci satelitních buněk M1 makrofágy (Loreti a Sacco, 2022) a jejich deplece ústí ke snížení míry proliferace satelitních buněk v reakci na poranění. Je také možné, že klodrosomy vedou mimo deplece makrofágů k depleci i jiných buněčných typů, mezi které mohou patřit i satelitní buňky.

V pozdějších pozorovaných dnech počet satelitních buněk v pulcích bez injekce XtiSC klesal. I přes stálou depleci makrofágů u pulců 7 dpa byla u skupin bez injekce XtiSC s makrofágy i u skupiny s jejich deplecí prokázána poměrně stejná hladina satelitních buněk. Injekce XtiSC ovšem vedla k udržení počtů satelitních buněk na vyšší hladině jak u skupin s makrofágy, tak s jejich deplecí. Díky tomuto zjištění vyvozujeme, že XtiSC svým působením zvyšují počty satelitních buněk v obnovující svalové tkáni nezávisle na makrofázích. Počty satelitních buněk mohou XtiSC navyšovat nepřímo produkcí cytokinů, růstových faktorů a oxidu dusnatého či přímo, pomocí vytvoření juxtakrinního spojení dovolujícího přenos mitochondrií, které bylo zpozorováno u Sertoliho buněk (Porubská a kol., 2021).

Pro lepší vizualizaci Pax7 satelitních buněk *in vivo* v budoucnosti jsme s mou kolegyní Zhao Qing Msc. a mým školitelem doc. RNDr. Ing. Vladimíra Krylovem, Ph.D. vytvořili vektor exprimující EGFP pod Pax7 promotorem. Pro integraci vektoru do genomu jsme využili metodu CRISPR-Cas9 využívající tzv. 2-bait systém (Mao a kol., 2018). Jako sekundární reportérový gen jsme zvolili červený fluorescenční protein (Katushka-RFP) pod γ -krystalinovým promotorem, který je v případě integrace vektoru exprimován v čočce pulce.

Do 1-buněčného embrya *X. tropicalis* mikroinjekoval školitel doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D. roztok obsahující 400 ng/ μ l Cas proteinu, 50 ng/ μ l gRNA a 150 ng/ μ l purifikovaného plazmidu. Injekce roztoku obsahujícího komponenty v těchto koncentracích ovšem vedla k velké úmrtnosti embryí, což nás přimělo ke snížení koncentrace gRNA na 30 ng/ μ l a námi vytvořeného plazmidu na 100 ng/ μ l. Tento krok vedl nejen k většímu přežívání embryí (z < 1 % na 33 % 1 den po injekci), ale také k úspěšnější integraci vektoru (z 8 přeživších embryí % na 19 %). Tato úspěšnost se dá pokládat za velmi dobrou, jelikož běžná úspěšnost v publikaci Mao a kol. (2018), ze které konstrukce našeho vektoru z podstatné části vychází, se pohybovala okolo 8 %.

Během doby vypracování této práce jsme provedli celkem 28 mikroinjekcí. Při každé mikroinjekci bylo injikováno průměrně 80 embryí, počet záležel na jejich kvalitě. Za všechny mikroinjekce byl zaznamenán RFP signál v obou očích u 16 pulců, RFP signál v 1 oku u 5 pulců a RFP signál společně s EGFP signálem u 22 pulců. EGFP signál nebyl v počátcích našich injekcí trvalý a po čase již nebyl viditelný.

Při posledních mikroinjekcích se podařilo získat celkem 13 pulců s RFP signálem v čočce i EGFP signálem převážně ve svalovině a peritoneu pulců, který byl znatelný i po týdnu pozorování. Pro potvrzení specifity EGFP signálu je třeba následné analýzy pulců.

Při správném vývoji pulců a integraci vektoru v jejich zárodečné linii bude v budoucnosti možné již začít s cíleným křížením pro získání stabilní transgenní linie *X. tropicalis* exprimující EGFP pod Pax7 promotorem, což zajistí lepší pozorování satelitních buněk na např. Lightsheet mikroskopu či pod fluorescenční binolupou.

8. Závěr

- Pomocí fluorescenčně značených liposomů jsme potvrdili, že naše metoda mikroinjekce do dorzální žíly pulců v blízkosti srdce vede ke stálé přítomnosti vpravené látky v celém krevním oběhu pulce *X. tropicalis* i po týdnu pozorování.
- Bylo prokázáno, že mikroinjekce klodrosomů do krevního oběhu pulců *X. tropicalis* vede k depleci makrofágů 1 dpa, 3 dpa i 7 dpa.
- Bylo prokázáno, že mikroinjekce XtiSC vede ke zvýšení počtu makrofágů 7 dpa u pulců *X. tropicalis* jak po jejich depleci pomocí klodrosomů, tak u kontrolní skupiny injikované prázdňými liposomy.
- Deplece makrofágů pomocí klodrosomů prokazatelně snižuje migrační schopnost XtiSC do místa amputace ocasu 3 dpa.
- S využitím DAF-2DA sondy pro vizualizaci oxidu dusnatého byla prokázána kolokalizace zeleného fluorescenčního signálu produkovaného oxidu dusnatého s červenou fluorescencí XtiSC v ocasu pulců *X. tropicalis*.
- Bylo prokázáno, že deplece makrofágů pomocí klodrosomů vede jak po injekci XtiSC, tak bez této injekce ke statisticky signifikantnímu snížení počtu satelitních buněk 1 dpa u pulců *X. tropicalis*.
- Injekce XtiSC prokazatelně zvýšila počet satelitních buněk u kontrolní skupiny injikované prázdňými liposomy 7 dpa.
- Byl vytvořen vektor exprimující EGFP pod Pax7 promotorem pro *in vivo* vizualizaci satelitních buněk.
- U pulců *X. tropicalis* byla zaznamenána integrace námi vytvořeného vektoru do jejich genomu metodou CRISPR Cas9, včetně pozorované RFP fluorescence v čočkách pulců a EGFP signálu v buňkách rozetých ve svalovině a peritoneu.

9. Seznam literárních zdrojů

- Abaffy, Pavel, Tomankova, Naraine, Kubista a Radek Sindelka. 2019. "The Role of Nitric Oxide during Embryonic Wound Healing." *BMC Genomics* 20(1).
- Abrams, John, Figdor, Malefyt, Bennett a De Vries. 1991. "Interleukin 10(IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 174(5):1209–20.
- Adams, Dany, Masi, a Levin. 2007. "H⁺ Pump-Dependent Changes in Membrane Voltage Are an Early Mechanism Necessary and Sufficient to Induce *Xenopus* Tail Regeneration." *Development* 134(7):1323–35.
- *Amaya, Offield a Grainger. 1998. "Frog Genetics: *Xenopus Tropicalis* Jumps into the Future." *Trends in Genetics* 14(7):253–55.
- Auer, Thomas, Durore, Cian, Concordet a Bene. 2014. "Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Knock-in in Zebrafish by Homology-Independent DNA Repair." *Genome Research* 24(1):142.
- Aztekin, Hiscock, Marioni, Gurdon, Simons a Jullien. 2019. "Identification of a Regeneration-Organizing Cell in the *Xenopus* Tail." *Science* 364(6441):653–58.
- Aztekin, Can, Hiscock, Butler, Andino, Robert, Gurdon a Jerome Jullien. 2020. "The Myeloid Lineage Is Required for the Emergence of a Regeneration-Permissive Environment Following *Xenopus* Tail Amputation." *Development (Cambridge)* 147(3).
- Beck, Caroline, Christen a Slack. 2003. "Molecular Pathways Needed for Regeneration of Spinal Cord and Muscle in a Vertebrate." *Developmental Cell* 5(3):429–39.
- Ben-Mordechai, Tamar, Holbova, Landa-Rouben, Harel-Adar, Feinberg, Elrahman, Blum, Epstein, Silman, Cohen a Leor. 2013. "Macrophage Subpopulations Are Essential for Infarct Repair With and Without Stem Cell Therapy." *Journal of the American College of Cardiology* 62(20):1890–1901.
- *Brüne, Bernhard, Dehne, Grossmann, J^{*}ung, Namgaladze, Schmid, Von Knethen a Weigert.

* Sekundární zdroj

2013. "Redox Control of Inflammation in Macrophages." *Antioxidants & Redox Signaling* 19(6):595.
- *Busse a Fleming. 1998. "Pulsatile Stretch and Shear Stress: Physical Stimuli Determining the Production of Endothelium-Derived Relaxing Factors." *Journal of Vascular Research* 35(2):73–84.
- Caplan, Arnold. 1991. "Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Orthopaedic Research* 9(5):641–50.
- Chiappalupi, Sara, Salvadori, Luca, Riuzzi, Calafiore, Donato a Sorci. 2017. "Employment of Microencapsulated Sertoli Cells as a New Tool to Treat Duchenne Muscular Dystrophy." *Journal of Functional Morphology and Kinesiology* 2(4).
- Choulika, André, Perrin, Dujon a Nicolas. 1995. "Induction of Homologous Recombination in Mammalian Chromosomes by Using the I-SceI System of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 15(4):1968.
- *Cornelissen, Maijenburg, Nolte a Voermans. 2015. "Organ-Specific Migration of Mesenchymal Stromal Cells: Who, When, Where and Why?" *Immunology Letters* 168(2):159–69.
- Danchuk, Svitlana, Ylostalo, Hossain, Sorge, Ramsey, Bonvillain, Lasky, Bunnell, Welsh, Prockop a Sullivan. 2011. "Human Multipotent Stromal Cells Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice via Secretion of Tumor Necrosis
- Djouad, Plence, Bony, Tropel, Apparilly, Sany, Noël, a Jorgensen. 2003. "Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stem Cells Favors Tumor Growth in Allogeneic Animals." *Blood* 102(10):3837–44.
- *Dort, Junio, Fabre, Molina a Dumont. 2019. "Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases." *Stem Cells International* 2019.
- Evans a Kaufman. 1981. "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature* 292(5819):154–56.
- Ferreira, Fernando, Raghunathan, Luxardi, Zhu, a Zhao. 2018. "Early Redox Activities Modulate *Xenopus* Tail Regeneration." *Nature Communications* 9(1).

- Fukazawa, Naora , Kunieda , a Kubo. 2009. "Suppression of the Immune Response Potentiates Tadpole Tail Regeneration during the Refractory Period." *Development (Cambridge, England)* 136(14):2323–27.
- Fuseler, John a Valarmathi. 2016. "Nitric Oxide Modulates Postnatal Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Migration." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4(NOV):133.
- Gibson a Schultz. 1983. "Age-Related Differences in Absolute Numbers of Skeletal Muscle Satellite Cells." *Muscle & Nerve* 6(8):574–80.
- Gilbert a Scott. 2000. "Regeneration."
- *Godwin, James a Rosenthal. 2014. "Scar-Free Wound Healing and Regeneration in Amphibians: Immunological Influences on Regenerative Success." *Differentiation* 87(1–2):66–75.
- *Godwin, Kuraitis, a Rosenthal. 2014. "Extracellular Matrix Considerations for Scar-Free Repair and Regeneration: Insights from Regenerative Diversity among Vertebrates." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 56:47–55.
- *Grainger a Robert. 2012. "Xenopus Tropicalis as a Model Organism for Genetics and Genomics: Past, Present, and Future." *Methods in Molecular Biology* 917:3–15.
- Haberlandt a Akad. n.d. *Culturversuehe Mit Isolierten Pflanzenzellen.*
- Heidenreich, Erich, Novotny, Kneidinger, Holzmann a Wintersberger. 2003. "Non-Homologous End Joining as an Important Mutagenic Process in Cell Cycle-Arrested Cells." *The EMBO Journal* 22(9):2274.
- Hellsten, Uffe, Harland, Gilchrist, Hendrix, Jurka, Kapitonov, Ovcharenko, Putnam, Shu, Taher, Blitz, Blumberg, Dichmann, Dubchak, Amaya, Detter, Fletcher, Gerhard, Goodstein, Graves, Grigoriev, Grimwood, Kawashima, Lindquist, Lucas, Mead, Mitros, Ogino, Ohta, . Poliakov, Pollet, Robert, Salamov, Sater, Schmutz, Terry, Vize, Warren, Wells, Wills, Wilson, Zimmerman, Zorn, Grainger, Grammer, Khokha, Richardson a Rokhsar. 2010. "The Genome of the Western Clawed Frog *Xenopus Tropicalis*." *Science* 328(5978):633–36.

- van Kampen, Johannes a van Rooij. 2019. "CRISPR Craze to Transform Cardiac Biology." *Trends in Molecular Medicine* 25(9):791–802.
- *Klimczak, Kozłowska a Kurpisz. 2018. "Muscle Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow Origin for Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophies." *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 66(5):341–54.
- *Koh a DiPietro. 2011. "Inflammation and Wound Healing: The Role of the Macrophage." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 13.
- De La Serrana, Garcia, Mareco a Johnston. 2014. "Systematic Variation in the Pattern of Gene Paralog Retention between the Teleost Superorders Ostariophysi and Acanthopterygii." *Genome Biology and Evolution* 6(4):981–87.
- Lee-Liu, Dasfne, Moreno, Almonacid, Tapia, Muñoz, von Marées, Gaete, Melo a Larraín. 2014. "Genome-Wide Expression Profile of the Response to Spinal Cord Injury in *Xenopus Laevis* Reveals Extensive Differences between Regenerative and Non-Regenerative Stages." *Neural Development* 2014 9:1 9(1):1–20.
- Li, Nan, Wang a Han. 2012. "Structural, Cellular and Molecular Aspects of Immune Privilege in the Testis." *Frontiers in Immunology* 3(JUN).
- Li, Wei, Xianping Liang, Leu, Kovalovich, Ciliberto a Rebecca Taub. 2001. "Global Changes in Interleukin-6-Dependent Gene Expression Patterns in Mouse Livers after Partial Hepatectomy." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33(6):1377–86.
- *Loreti, Mafalda a Sacco. 2022. "The Jam Session between Muscle Stem Cells and the Extracellular Matrix in the Tissue Microenvironment." *Npj Regenerative Medicine* 2022 7:1 7(1):1–15.
- Love, Nick, Chen, Bonev, Gilchrist, Fairclough, Lea, Mohun, Paredes, Zeef a Amaya. 2011. "Genome-Wide Analysis of Gene Expression during *Xenopus Tropicalis* Tadpole Tail Regeneration." *BMC Developmental Biology* 11.
- Love, Nick, Chen, Ishibashi, Kritsiligkou, Lea, Koh, Gallop, Dorey a Amaya. 2013. "Amputation-Induced Reactive Oxygen Species Are Required for Successful *Xenopus* Tadpole Tail Regeneration." *Nature Cell Biology* 15(2):222–28.

- Lu, Geming, Zhang, Geng, Peng, Jayaraman, Chen, Xu, Yang, Li, Zheng, Shen, Wang, Liu, Wang, Zheng, Feng Qi, Si, Cijiang He, Liu, Lira, Sikora, Li a Xiong. 2015. "Myeloid Cell-Derived Inducible Nitric Oxide Synthase Suppresses M1 Macrophage Polarization." *Nature Communications* 2015 6:1 6(1):1–14.
- *Lu, Paul, Blesch a Tuszynski. 2004. "Induction of Bone Marrow Stromal Cells to Neurons: Differentiation, Transdifferentiation, or Artifact?" *Journal of Neuroscience Research* 77(2):174–91.
- Maekawa, Kamimura a Nagano. 1996. "Peritubular Myoid Cells in the Testis: Their Structure and Function." *Archives of Histology and Cytology* 59(1):1–13.
- Mao, Cheng-Zhou, Zheng, Zhou, Wu, Xia, Liang, Guo, Peng, Zhao, Cai, Kim, Park, Cai, Qi, Mao, Zheng, Zhou, Wu, Liang, Guo, Zhao, Cai, Kim, Park, Cai a Qi. 2018. "CRISPR/Cas9-Mediated Efficient and Precise Targeted Integration of Donor DNA Harboring Double Cleavage Sites in *Xenopus Tropicalis*." *The FASEB Journal* 32(12):6495–6509.
- *Mescher, Anthony, Neff a King. 2017. "Inflammation and Immunity in Organ Regeneration." *Developmental & Comparative Immunology* 66:98–110.
- Moscou, Matthew a Bogdanove. 2009. "A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors." *Science (New York, N.Y.)* 326(5959):1501.
- *Mruk, Dolores a Cheng. 2015. "The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation." *Endocrine Reviews* 36(5):564.
- Nakanishi a Shiratsuchi. 2004. "Phagocytic Removal of Apoptotic Spermatogenic Cells by Sertoli Cells: Mechanisms and Consequences." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27(1):13–16.
- Nejak-Bowen, Kari, Orr, Bowen a Michalopoulos. 2013. "Conditional Genetic Elimination of Hepatocyte Growth Factor in Mice Compromises Liver Regeneration after Partial Hepatectomy." *PloS One* 8(3).
- Nguyen, Xuan, Vegrichtova, Tlapakova, Krulova a Krylov. 2019. "Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes the Differentiation Potential of *Xenopus Tropicalis* Immature Sertoli Cells." *Stem Cells International* 2019.

- Pittenger, Mark , Mackay, Beck, Jaiswal, Douglas, Mosca, Moorman, Simonetti, Craig, a Marshak. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science* 284(5411):143–47.
- Porubska, Bianka, Vasek, Somova, Hajkova, Hlaviznova, Tlapakova, Holan a Krulova. 2021. "Sertoli Cells Possess Immunomodulatory Properties and the Ability of Mitochondrial Transfer Similar to Mesenchymal Stromal Cells." *Stem Cell Reviews and Reports* 2021 17:5 17(5):1905–16.
- Punkt, Karla, Naupert, Wellner, Asmussen, Schmidt a Buchwalow. 2002. "Nitric Oxide Synthase II in Rat Skeletal Muscles." *Histochemistry and Cell Biology* 118(5):371–79.
- Ren, Yi a Young. 2013. "Managing Inflammation after Spinal Cord Injury through Manipulation of Macrophage Function." *Neural Plasticity* 2013.
- Ren, Zhang, Zhao, Xu, Zhang, Roberts, Zhao a Shi 2008. "Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide." *Cell Stem Cell* 2(2):141–50.
- Rhee, Lee a Eom. 2015. "Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression." *International Journal of Molecular Sciences* 16(12):30015–33.
- Rooijen, Nico van a Hendrikx. 2010. "Liposomes for Specific Depletion of Macrophages from Organs and Tissues." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 605:189–203.
- Ryan, Jennifer, Barry, Murphy a Mahon. 2005. "Mesenchymal Stem Cells Avoid Allogeneic Rejection." *Journal of Inflammation (London, England)* 2:8.
- Saleh-Gohari, Nasrollah a Helleday. 2004. "Conservative Homologous Recombination Preferentially Repairs DNA Double-Strand Breaks in the S Phase of the Cell Cycle in Human Cells." *Nucleic Acids Research* 32(12):3683.
- Salvadori, Laura, Chiappalupi, Arato, Mancuso, Calvitti, Marchetti, Riuzzi, Calafiore, Luca, a Sorci. 2021. "Sertoli Cells Improve Myogenic Differentiation, Reduce Fibrogenic Markers, and Induce Utrophin Expression in Human Dmd Myoblasts." *Biomolecules* 11(10).
- Santosh, Neetha, Windsor, Mahmoudi, Li, Zhang, Chernoff, Rao, Stocum a Song. 2011. "Matrix Metalloproteinase Expression during Blastema Formation in Regeneration-Competent

- versus Regeneration-Deficient Amphibian Limbs.” *Developmental Dynamics* 240(5):1127–41.
- Sato, Kazuya, Ozaki, Oh, Meguro, Hatanaka, Nagai, Muroi a Ozawa. 2007. “Nitric Oxide Plays a Critical Role in Suppression of T-Cell Proliferation by Mesenchymal Stem Cells.” *Blood* 109(1):228–34.
- *Schaffer, Tantry, Gross, Wasserburg a Barbul. 1996. “Nitric Oxide Regulates Wound Healing.” *The Journal of Surgical Research* 63(1):237–40.
- Schneider, Barbara a James Tidball. 1994. “Differential Response of Macrophage Subpopulations to Soleus Muscle Reloading after Rat Hindlimb Suspension.” *Journal of Applied Physiology* 77(1).
- Schultz, Edward, Jaryszak a Valliere. 1985. “Response of Satellite Cells to Focal Skeletal Muscle Injury.” *Muscle & Nerve* 8(3):217–22.
- Seale, Patrick, Sabourin, Girgis-Gabardo, Mansouri, Gruss a Rudnicki. 2000. “Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells.” *Cell* 102(6):777–86.
- Sessas, William, Harrison, Barber, Zengs, Durieuxn, D’angelo, Lynchsll a Peach. 1992. Molecular Cloning and Expression of a CDNA Encoding Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase*.” *Journal of Biological Chemistry* 267(22):15274–76.
- Shapiro a Zwarenstein. 1934. “A Rapid Test for Pregnancy on *Xenopus Lævis* [12].” *Nature* 133(3368):762.
- *Singer a Clark. 1999. “Cutaneous Wound Healing” edited by F. H. Epstein. *The New England Journal of Medicine* 341(10):738–46.
- *Snykers, Sarah, Kock, Tamara a Rogiers. 2011. “Hepatic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: In Vitro Strategies.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 698:305–14.
- Tlapakova, Nguyen, Vegrichtova, Sidova, Strnadova, Blahova a Krylov. 2016. “Identification and Characterization of *Xenopus Tropicalis* Common Progenitors of Sertoli and Peritubular Myoid Cell Lineages.” *Biology Open* 5(9):1275–82.
- Urnov, Fyodor, Miller, Lee, Beausejour, Rock, Augustus, Jamieson, Porteus, Gregory, a Holmes. 2005. “Highly Efficient Endogenous Human Gene Correction Using Designed Zinc-Finger

- Nucleases." *Nature* 435(7042):646–51.
- Vellasamy, Shalini, Sandrasaigaran, Vidyadaran, George a Ramasamy. 2012. "Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Placenta Tissue." *World Journal of Stem Cells* 4(6):53.
- Vieira, Warren a McCusker. 2018. "Regenerative Models for the Integration and Regeneration of Head Skeletal Tissues." *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 3752 19(12):3752.
- Vogg, Matthias, Galliot a Tsiairis. 2019. "Model Systems for Regeneration: Hydra." *Development (Cambridge)* 146(21).
- Wang, Xin, Gray, Willette-Brown, Zhu, Shi, Jiang, Song, Dong a Hu. 2018. "Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase Circulates Inflammation and Promotes Lung Carcinogenesis." *Cell Death Discovery* 2018 4:1 4(1):1–12.
- Westra, Edze, Semenova, Datsenko, Jackson, Wiedenheft, Severinov a Brouns. 2013. "Type I-E CRISPR-Cas Systems Discriminate Target from Non-Target DNA through Base Pairing-Independent PAM Recognition." *PLoS Genetics* 9(9).
- Zhan, Rixing, He, Wang, Yao, Tan, Xu, Zhou, Wang, Li, Wu a Luo. 2016. "Nitric Oxide Promotes Epidermal Stem Cell Migration via CGMP-Rho GTPase Signalling." *Scientific Reports* 2016 6:1 6(1):1–12.
- Zhan, Rixing, Yang, He, Wang, Tan, Zhou, Yang, Yao, Wu a Luo. 2015. "Nitric Oxide Enhances Keratinocyte Cell Migration by Regulating Rho GTPase via CGMP-PKG Signalling." *PLOS ONE* 10(3):e0121551.
- Wróblowá. 2020. "Studium regeneračného potenciálu progenitorů Sertoliho buněk u pulců *Xenopus tropicalis* po amputaci ocasu"