Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Mgr. Silvie Tománková

Úloha oxidu dusnatého (NO) v průběhu embryonálního vývoje pokožky drápatky vodní

The role of nitric oxide (NO) during *Xenopus laevis* embryonic epidermis development

Disertační práce

Školitel: Mgr. Radek Šindelka, Ph.D.

Laboratoř genové exprese

Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.

Praha, 2018

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, 1.8.2018

_____

Mgr. Silvie Tománková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Radku Šindelkovi, PhD. za odborné vedení mé práce, trpělivost a cenné rady při jejím řešení. Poděkování si zaslouží také všichni členové Laboratoře genové exprese za vytvoření vhodných podmínek pro vyhotovení experimentální části disertační práce a zejména za přátelské prostředí. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a nejbližším, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali a povzbuzovali.

Abstrakt

Oxid dusnatý (NO) je zajímavá molekula účastnící se mnoha důležitých biologických funkcí jako je vazodilatace cév, neurotransmise, imunitní odpověď nebo buněčná proliferace. Tato práce ukazuje zásadní úlohu NO během embryonálního vývoje pokožky drápatky vodní. Vnější vrstva embryonální epidermis drápatky vodní je složena ze 4 typů buněk (malých sekrečních buněk, multi-ciliárních buněk, ionocytů a tzv. „goblet“ buněk) a svým složením se podobá specializovaným epiteliím jako je lidský respirační epitel. Díky této podobnosti se embryonální epidermis drápatky vodní stala vhodným modelem pro studium lidských mukózních a mukociliárních epitelií a jejich defektů.

Pomocí molekulárních a imunohistochemických metod bylo v rámci této práce zjištěno, že NO je produkovaný zejména ionocyty a multi-ciliárními buňkami. Studium molekulárních a buněčných změn u embryí s inhibovanou produkcí NO odhalilo nezbytnost tohoto radikálu pro správné formování a fungování mukociliárního epitelu. Inhibice NO vedla ke snížení množství specializovaných epidermálních typů (malých sekrečních buněk, ionocytů a multi-ciliárních buněk) a k zásadním strukturním změnám multi-ciliárních buněk. Ukázalo se, že NO ovlivňuje vývoj embryonální epidermis skrz kanonickou sGC-cGMP-PKG signální dráhu. Mechanismus působení NO na vývoj embryonální epidermis je pravděpodobně regulací exprese genů nezbytných pro vývoj této tkáně.

Celkově tato práce ukazuje novou úlohu NO během embryonálního vývoje epidermis drápatky vodní se zásadním vlivem pro multiciliogenezi a lepší porozumění vývoje lidského mukociliárního plicního epitelu a jeho defektů.

Abstract

Nitric oxide (NO) is an interesting molecule, which is involved in many important biological processes such as vasodilatation, neurotransmission, immune response and cell proliferation. This work presents the crucial role of NO during the *Xenopus laevis* embryonic epidermis development. The outer layer of the embryonic epidermis is composed of 4 cell types (small secretory cells, multi-ciliated cells, ionocytes and goblet cells). Embryonic epidermis composition reflects specialized epithelia such as a respiratory epithelium of mammals. Therefore, *Xenopus* embryonic epidermis has become a suitable model for the study of human mucosal and mucociliary epithelium and their defects.

I found that NO is mainly produced in ionocytes and multi-ciliated cells by using molecular and immunohistochemical approaches. The study of molecular and cellular phenotype changes in embryos with inhibited NO production revealed the necessity of this molecule for correct formation and function of the mucociliary epithelium. NO inhibition caused reduction of specialized epidermal cell types (small secretory cells, ionocytes and multi-ciliated cells) and structural changes in multi-ciliated cells. I also showed that NO affects the development of the embryonic epidermis through the sGC-cGMP-PKG signaling pathway, probably by regulation of gene expression of the downstream targets necessary for the development of this tissue.

Overall, this work shows a new role of NO during the *Xenopus laevis* embryonic epidermis development with crucial impact on multiciliogenesis and a better understanding of the development of human mucociliary lung epithelium and its defects.

Seznam použitých zkratek

5HT	serotonin
actb	β-aktin
aPKC	atypická protein kináza C
atp4a	α-podjednotka H+/K+ ATPasy
bbof1	faktor pro orientaci bazálních tělísek
BH4	tetrahydrobiopterin
BMP	kostní morfogenetický protein
ca12	karbonická anhydráza 12
cc10	uteroglobin
Ccno	Cyklin O
cep	centrosomální protein
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
col	kolagen
cp110	centriolární protein 110kDa
DAF-2DA	5,6-Diaminofluorescein diacetát
DAF-FM DA	4-Amino-5-Methylamino-2′:7′-Difluorofluorescein Diacetát
Deup-1	deuterosomální protein
dll1	delta1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Dvl	Dishevelled
E2F4	transkripční faktor E2F4
E2F5	transkripční faktor E2F5
EDRF	endoteliální relaxační faktor
eNOS (NOSIII)	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
EtOH	ethanol
ezr	ezrin
FAM	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
foxa1	forkhead box A1
foxJ1	forkhead box J1
gmnc	geminin
H+ vATPasy	protonové pumpy
Htr3	serotoninový receptor
iNOS (NOSII)	indukovaná syntáza oxidu dusnatého
Intu	Inturnet
IRF-1	interferon regulační faktor 1
itln2	itelektin 2, xeel
krt	keratin
lam	laminin
LiCl	lithium chlorid
MCCs	multi-ciliární buňky
mcidas	multicilin

mct4	monokarboxylátový přenašeč 4
MeOH	methanol
miR	mikro RNA
mmp	matrix metalopeptidáza
MO	morpholino oligonukleotidy
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NFW	voda bez nukleáz
nNOS (NOSI)	neuronální syntáza oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1
PAK	p21 aktivovaná protein kináza
PBEC	primární bronchiální epiteliální buňky
PCD	primární ciliární dyskineze
PCP	planární buněčná polarita
PDE	fosfodiesteráza
PFA	paraformaldehyd
PKC	protein kináza C
PKG	protein kináza G
plk4	polo kináza
PNA	lektinový aglutinin
RNA	ribonukleová kyselina
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
Sas6	strukturní centriolární protein
sGC	solubilní guanylátcykláza
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine
Sox2	SRY box 2
SSCs	malé sekreční buňky
St	stádium
TRIM	1-(2-Trifluoromethylphenyl) imidazole
tuba	tubulin
Ubp1	RNA vazebný protein
v1a (atp6v1a)	komponenta vakuolární protonové pumpy
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

Obsah

Autorské publikace ... 11

1 Úvod ... 13

2 Cíle ... 14

3 Literární přehled ... 15

3.1 *Xenopus laevis* ... 15

3.1.1 Drápatka vodní jako modelový organismus ... 16

3.1.2 Embryonální vývoj drápatky vodní ... 16

3.2 Ciliární epitel ... 24

3.2.1 Multiciliogeneze ... 26

3.2.2 Lidský respirační mukociliární epitel ... 33

3.3 Oxid dusnatý ... 35

3.3.1 NO syntázy ... 35

3.3.2 Působení NO v organismu ... 37

4 Materiál a metody ... 39

4.1 Modelový organismus a manipulace s embryi ... 39

4.1.1 Pokusná zvířata ... 39

4.1.2 Kultivace a manipulace s embryi drápatky vodní ... 39

4.1.3 Použití chemických donorů a inhibitorů NO signalizace ... 39

4.1.4 Morpholino oligonukleotidy ... 40

4.2 Mikroskopické techniky ... 40

4.2.1 Barvení NO ... 40

4.2.2 Imunohistochemická barvení ... 41

Tab. 1 Použité primární a sekundární protilátky ... 42

4.2.3 Příprava vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) ... 42

4.2.4 Barvení kolagenů ... 42

4.3 Studium genové exprese 43
4.3.1 Sběr embryonální epidermis 43
4.3.2 Izolace RNA 43
4.3.3 Stanovení genové exprese u embryí se zablokovanou produkcí NO během vývoje pomocí RNA-Seq 45
4.3.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR) 46
4.4 Lokalizace RNA pomocí *in situ* hybridizace 48
4.4.1 Transformace bakterií 48
4.4.2 Kultivace bakterií a izolace plazmidové DNA 49
4.4.3 Příprava sondy pro *in situ* hybridizaci (whole mount) 49
4.4.4 *In situ* hybridizace (whole mount) 51
4.5 Lidské primární bronchiální epiteliální buňky (PBEC) 52
4.5.1 Kultivace PBEC 52
4.5.2 Inhibice oxidu dusnatého (NO) 53
4.5.3 Počítání buněk v Bürkerově komůrce 53
4.5.4 Měření množství proteinu CC10 53
4.6 Seznam běžných chemikálií použitých v této práci 54
5 Výsledky 56
5.1 Produkce oxidu dusnatého (NO) v embryonálním vývoji drápatky vodní 56
5.1.1 Produkce NO v embryonální pokožce 56
5.1.2 Produkce NO v dalších oblastech embrya 60
5.2 Určení epidermálního buněčného typu produkujícího NO 64
5.3 Vliv ztráty produkce NO na vývoj embryonální epidermis 66
5.3.1 Fenotypový projev embryí s inhibovanou produkcí NO 66
5.3.2 Vliv inhibice NO na embryonální pokožku 67
5.3.3 Potvrzení specifického působení NO na MCCs 70
5.4 Ověření působení NO na embryonální pokožku přes kanonickou NO-sGC-cGMP-PKG signální dráhu 72

5.5 Účinek inhibice NO na úrovni genové exprese 76
5.6 Zjištění vývojového stádia ve kterém je NO nezbytný pro vývoj MCCs 80
5.7 Souvislost NO a Notch signální dráhy 84
5.8 Působení NO na proces multiciliogeneze 86
5.8.1 Vliv NO na tvorbu bazálních tělísek a aktinu 86
5.8.2 Účinek inhibice NO na úrovni genové exprese 88
5.9 Úloha NO v lidském bronchiálním epitelu 89
6 Diskuze 94
7 Shrnutí a závěr 102
8 Seznam literatury 104

Autorské publikace

Tomankova S, Abaffy P, Sindelka R. **The role of nitric oxide during embryonic epidermis development of *Xenopus laevis*.** Biol Open. **2017** Jun;6(6) 862-871. doi:10.1242/bio.023739

Disertační práce je sepsána zejména na základě mé prvoautorské publikace, která popisuje zásadní úlohu oxidu dusnatého (NO) během embryonálního vývoje pokožky drápatky vodní, s významným dopadem pro budoucí studium lidských mukózních a mukociliárních epitelií a jejich defektů.

Sindelka R, Abaffy P, Qu Y, **Tomankova S**, Sidova M, Naraine R, Kolar M, Peuchen E, Sun L, Dovichi N, Kubista M. **Asymmetric distribution of biomolecules of maternal origin in the *Xenopus laevis* egg and their impact on the developmental plan**. Sci Rep. **2018** May 29;8(1):8315. doi: 10.1038/s41598-018-26592-1.

Pro vývoj je nezbytná asymetrická distribuce biomolekul, umožňující vznik tělní osové polarity, specifikaci zárodečných buněk nebo formování buněk v blastule. V rámci této práce byla studována lokalizace RNA a proteinů ve vajíčku drápatky vodní podél animálně-vegetální osy. Jelikož asymetrická lokalizace biomolekul souvisí s vývojem embryonální pokožky, bylo studování tohoto procesu součástí mé disertační práce.

Sidova M, **Tomankova S**, Abaffy P, Kubista M, Sindelka R. **Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality.** Biomol Detect Quantif. **2015** Sep;5 3-9. doi:10.1016/j.bdq.2015.08.002.

V rámci disertační práce byla testována genová exprese pomocí RT-qPCR a transkriptomová analýza pomocí RNA sekvenování. Pro tyto metody je zásadní kvalita a integrita vstupního materiálu, která ovlivňuje přesnost a spolehlivost analýzy nukleových kyselin. Tato publikace se zabývá porovnáním hodnocení kvality RNA na základě analýzy ribosomální RNA ve srovnání s dalšími typy hodnocení kvality RNA.

Tomankova S, Abaffy P, Naraine R, Langerova L, Palmberg L, Upadhyay S, Sindelka R **The role of nitric oxide during multiciliogenesis.** (in preparation)

Na základě výsledků, které jsem získala v roce 2018 v rámci mé stáže v laboratoři Dr. Palmberg na Karolinské Univerzitě ve Švédsku, vypracovávám publikaci porovnávající vliv inhibice produkce NO během procesu multiciliogeneze u embryonální epidermis drápatky vodní a lidských primárních bronchiálních epiteliálních buněk.

1 Úvod

Oxid dusnatý (NO) je produkovaný 3 syntázami (endoteliální, neuronální a indukovanou). Výskyt NO je v organismu naprosto nezbytný, jelikož NO je součástí mnoha důležitých biologických procesů, jako je vazodilatace cév, neurotransmise nebo v průběhu imunitní odpovědi. NO se rutinně používá pro léčbu plicní hypertenze a je také bioindikátorem zánětlivých procesů – zvýšená koncentrace vydechovaného NO je typická u pacientů trpících astmatem, zatímco nízká koncentrace NO je charakteristická pro primární ciliární dyskinezi.

Nedávná studie ukázala produkci NO v embryonální pokožce drápatky vodní, která se svým složením podobá lidským mukózním a mukociliárním epiteliím, díky čemuž se stala vhodným modelem pro studium těchto tkání a jejich defektů. Embryonální pokožka drápatky vodní je dvouvrstvý epitel složený z vnitřní (senzorické) a vnější (povrchové vrstvy). V diferencované vnější epidermální vrstvě se vyskytují 4 buněčné typy (ionocyty, multi-ciliární buňky, „goblet“ buňky a malé sekreční buňky), zatímco vnitřní vrstva je tvořena bazálními buňkami. Velký význam má model embryonální pokožky drápatky vodní zejména pro studium procesů multiciliogeneze.

Tato práce je zaměřena na studium úlohy NO během vývoje pokožky drápatky vodní a jelikož je embryonální pokožka drápatky vodní využívaná jako model pro studium lidských mukociliárních epitelií (jako je respirační epitel), byl vliv NO testován také na modelu lidských primárních bronchiálních epiteliálních buněk. Výsledky povedou k lepšímu porozumění vývoje mukociliárních epitelií a jsou základem pro rozsáhlejší studii vlivu NO na proces multiciliogeneze a ciliárních dysfunkcí.

2 Cíle

Cílem disertační práce bylo studium oxidu dusnatého v průběhu embryonálního vývoje, se zaměřením na vývoj pokožky. Jako vhodný modelový organismus byla zvolena drápatka vodní (*Xenopus laevis*).

Stanovené cíle:

1) Identifikace produkce oxidu dusnatého v embryonální epidermis drápatky vodní
2) Popis fenotypových změn u embryí se zablokovanou produkcí oxidu dusnatého
3) Identifikace kandidátních genů, jejichž exprese je regulována oxidem dusnatým
4) Studium procesů závislých na oxidu dusnatém

3 Literární přehled

3.1 *Xenopus laevis*

Xenopus laevis (drápatka vodní) patří mezi drápkaté žáby z čeledi *Pipidae*. Jedná se o allotetraploidní bezjazyčnou žábu, která má na předních končetinách 4 prsty bez plovacích blán a na zadních končetinách 5 prstů s plovacími blánami z nichž 3 prsty jsou opatřeny drápky – odtud odvozen i název tohoto obojživelníka (Obr. 1). Drápatka vodní je původem z centrální Afriky, kde dochází k častým změnám vodní hladiny, díky čemuž jsou tyto žáby dobře adaptované na široký rozsah teplot a zvýšenou salinitu. Samec je od samice snadno rozeznatelný díky výraznému pohlavnímu dimorfismu. Obecně jsou samice o třetinu větší a mají kloakální vak (Obr. 1).

Obr. 1 Pohlavní dimorfismus drápatky vodní. Samice je o třetinu větší a má výrazný kloakální vak

V minulosti (30 – 60 léta 20. století) byly samice rodu *Xenopus* hojně využívány pro prokázání těhotenství, jelikož jsou schopné reagovat na lidský choriový gonadotropin, který u nich stimuluje ovulaci oocytů. Moč potenciálně těhotné ženy byla injikována pod kůži do lymfatických vaků žáby a v případě přítomnosti gonadotropinu v moči ženy došlo ke stimulaci ovulace a nakladení oocytů (Gurdon and Hopwood, 2000).

Třída: Amphibia, Řád: Anura, Čeleď: Pipidae, Rod: Xenopus, Druh: Xenopus laevis

3.1.1 Drápatka vodní jako modelový organismus

Drápatka vodní se v minulosti stala jedním z nejvýznamějších modelů v oblasti vývojové biologie. Nesporné výhody pro biomedicínský výzkum ve srovnání se savčím modelem jsou dány zejména vnějším oplozením s následně dobře pozorovatelným embryonálním vývojem. Z jedné snůšky je možné získat až tisíce vajíček a díky jejich dostatečné velikosti je drápatka optimálním modelem pro různé formy manipulací jako jsou mikromanipulace (injikace – mRNA/DNA, morpholino oligonukleotidy, proteiny, léky), farmakologické testování, ex/transplantace, ablace nebo disrupce (Sive *et al.*, 2000). Navíc je možné využití stejné samice k opětovné stimulaci ovulace jednou za 3 měsíce a tento obojživelník je nenáročný na chov. Jelikož je drápatka vodní allotetraploidní, není vhodná pro genetické studie (možné nahrazení drápatkou tropickou – rovněž hojně využívanou ve výzkumu).

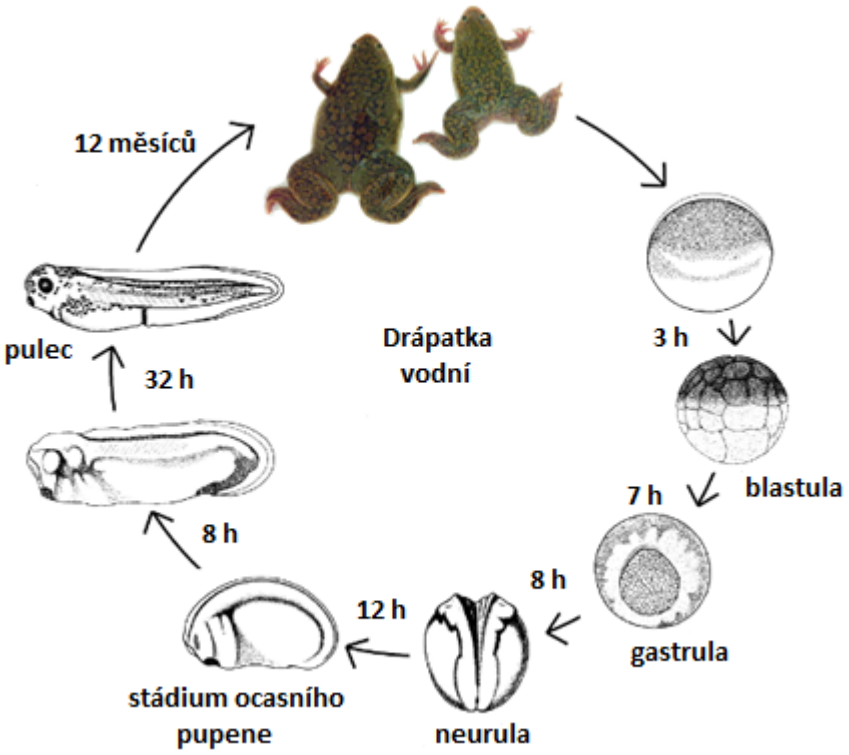
Významnost tohoto modelového organismu umocňuje udělení Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství Siru John Gurdonovi v roce 2012. Transferem jader střevních buněk do enukleovaných zralých oocytů s následným normálním vývojem v pulce prokázal, že jádra diferencovaných buněk jsou schopné reprogramovat do stádia pluripotentních kmenových buněk (Gurdon *et al.*, 1958; Gurdon, 1962). Tento objev otevřel cestu ke klonování.

Studie na drápatce vodní rovněž přispěly k objasnění mechanismů řízení buněčného cyklu, replikace chromozomů, struktury chromatinu a jádra, existence mitochondriální DNA nebo pro studium asymetrického dělení buněk (Newport and Kirschner, 1982; Sindelka *et al.*, 2010; Harland and Grainger, 2011; Sidova *et al.*, 2015a). V poslední době se také díky významné podobnosti embryonální epidermis drápatky vodní s lidským mukociliárním epitelem stává drápatka slibným kandidátem pro studium mukózních a mukociliárních epitelií a jejich defektů *in vivo* (jako je cystická fibróza nebo astma) (Dubaissi and Papalopulu, 2011; Walentek *et al.*, 2014; Walentek *et al.*, 2015).

3.1.2 Embryonální vývoj drápatky vodní

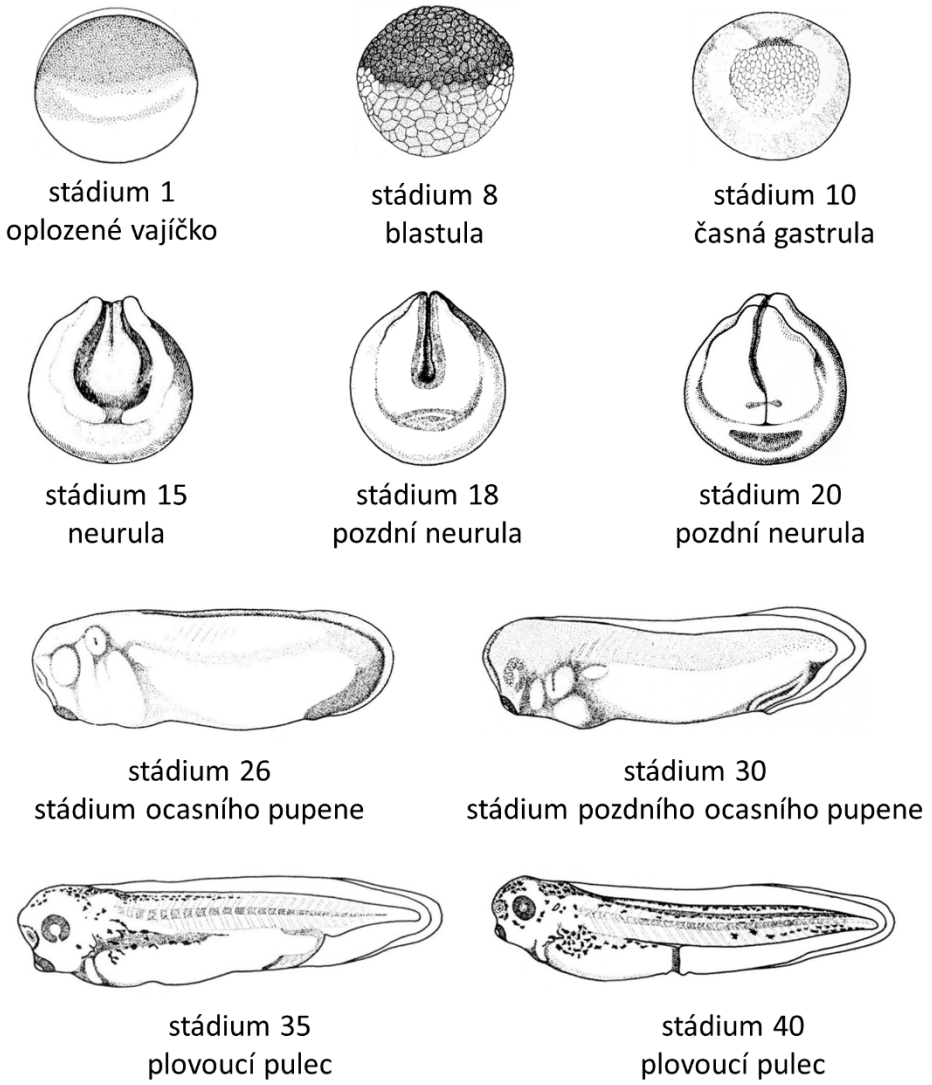
Životní cyklus drápatky vodní začíná oplozením vajíčka spermií s následným holoblastickým radiálním rýhováním buňky, vedoucí k tvorbě blastuly. Vývoj

pokračuje gastrulací, neurulací a organogenezí s následným samotným růstem pulce. Larvální stádium je ukončeno hormonálně řízenou metamorfózou v dospělého jedince (Obr. 2).



Obr. 2 Životní cyklus drápatky vodní (převzato a upraveno z http://www.xenbase.org/anatomy/intro.do)

Jelikož je tato práce zaměřena na období embryonálního vývoje od oplození vajíčka po stádium časného pulce (v rámci studia pokožky), jsou níže popsány základní procesy embryonálního vývoje související s formováním epidermis. Pro přehlednost je v textu použito rozdělení embryonálního vývoje drápatky vodní do jednotlivých stádií dle (Nieuwkoop and Faber, 1994). Příklady jednotlivých používaných vývojových stádií viz. Obr. 3.



Obr. 3 Přehled vývojových stádií drápatky vodní použitých v této práci dle Nieuwkoop and Faber, 1994 (obrázky vývojových stádií převzaty z www.xenbase.org)

3.1.2.1 Rýhování a tvorba blastuly

Po oplození vajíčka spermií dochází (pod kontrolou maternálních faktorů) k tvorbě stovek buněk mitotickým dělením. V buněčném cyklu je přeskočena G1 a G2 fáze, díky čemuž nedochází k nárůstu buněčné hmoty, ale pouze ke zvyšování počtu buněk. Během této časné fáze vývoje nedochází k zygotické transkripci (Gilbert and Barresi, 2016) - až na výjimky (Skirkanich *et al.*, 2011).

Po několika buněčných děleních se v animální hemisféře formuje blastocoel, který částečně odděluje animální buňky od vegetativních a je nezbytný pro pohyb

buněk během gastrulace (stádium 9 – 12) (Gilbert and Barresi, 2016). Následně dochází ve stádiu střední blastuly k aktivaci transkripce (tranzice střední blastuly), zajišťující zygotickou genovou expresi, nezbytnou pro aktivaci gastrulace a specifikaci buněk (Bachvarova *et al.*, 1966; Newport and Kirschner, 1982; Gilbert and Barresi, 2016).

Je známo, že již uvnitř oocytu jsou maternální determinanty lokalizovány asymetricky. Asymetrická lokalizace umožňuje nerovnoměrné rozdělení maternálních faktorů do dceřiných buněk a je nezbytná pro vznik rozdílných buněk během dělení. Asymetrická distribuce je součástí mnoha biologických procesů, jako je určování tělní osové polarity nebo specifikace zárodečných buněk. Studium regulace buněčné polarity je nezbytné pro pochopení formování buněk v blastule a pro vývoj celého jedince (Houston, 2013). Asymetrická lokalizace RNA a proteinů úzce souvisí rovněž s vývojem pokožky, proto jsem se touto problematikou zabývala v rámci jiného projektu v Laboratoři Genové exprese (Sindelka *et al.*, 2018).

3.1.2.2 Gastrulace

Blastula se invaginací buněk mění v gastrulu, kdy místo vnoření buněk je označováno jako blastopor (provústa). Masivní migrací buněk se v gastrule vytvoří tři zárodečné listy – ektoderm, endoderm a mezoderm. Na povrchu gastruly se nachází ektoderm, který je základem pro tvorbu epidermis a nervové tkáně (neuroektoderm). Ve vnitřní oblasti gastruly je endoderm, jakožto prekurzor vnitřních orgánů (játra, plíce, zažívací trakt) a mezi ektodermem a endodermem se nachází mezoderm, ze kterého vznikají srdce, pojivové tkáně (svaly, kostra, krevní oběh), vylučovací a reprodukční soustava (Gilbert and Barresi, 2016).

V časných stádiích gastrulace je vnější část embrya tvořena několika vrstvami nediferencovaného epitelu (Billett and Gould, 1971). Následně dochází k interkalaci ektodermu, což má za následek spojení vnější (povrchové) a vnitřní (senzorické) vrstvy do dvouvrstvého nediferencovaného epitelu (Keller, 1980). V této fázi se již ektoderm rozděluje na epidermální a nervovou tkáň (Billett and Gould, 1971).

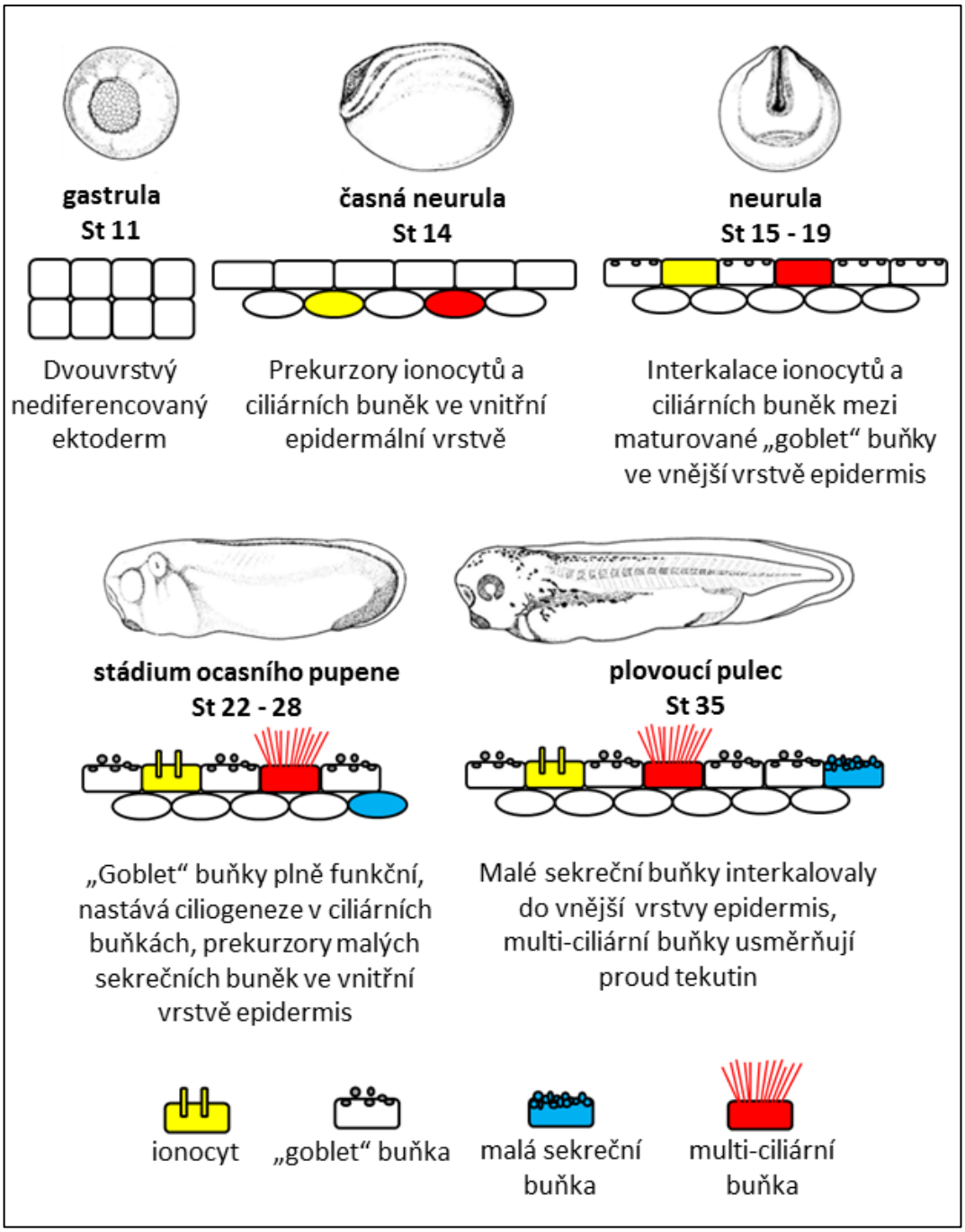
3.1.2.3 Vývoj embryonální epidermis drápatky vodní

Pokožka drápatky vodní se vyvíjí z ektodermu (Chang and Hemmati-Brivanlou, 1998). Zpočátku se jedná o nediferencovaný dvouvrstvý epitel s vnitřní (senzorickou) a vnější (povrchovou) vrstvou (stádium 11). První diferenciace pokožky

nastává v průběhu pozdní gastrulace a časné neurulace, kdy dochází k polarizaci vnější vrstvy epidermálních buněk a ke strukturním změnám ve vnitřní vrstvě pokožky (stádium 12 – 16). Senzorická vrstva je složená z menších, volně adherujících buněk, zatímco vnější vrstva z velkých těsně adherujících cylindrických buněk (Billett and Gould, 1971; Asada-Kubota, 1989).

Pod kontrolou Notch signalizace (mechanismem laterální inhibice) dochází ve vnitřní vrstvě epidermis k vývoji prekurzorů ciliárních buněk a ionocytů. Budoucí prekurzory exprimují na svém povrchu transmembránový ligand Delta1 (dll1). Vazbou ligandu Delta1 s receptorem Notch se u sousedních buněk aktivuje Notch dráha, což vede k transkripci genů blokujících specifikaci těchto buněk. Buňky s aktivovanou Notch dráhou zůstávají nediferencované ve vnitřní vrstvě epidermis, zatímco prekurzory ciliárních buněk a ionocytů během neurulace (stádium 15 – 19) interkalují do vnější vrstvy epidermis, kde jsou rovnoměrně distribuovány (Deblandre *et al.*, 1999; Marnellos *et al.*, 2000; Stubbs *et al.*, 2006; Quigley *et al.*, 2011). Distribuci těchto buněk nezajišťuje pouze specifikace buněk pomocí laterální inhibice, ale regulujícím krokem je rovněž vmezeření do vnější vrstvy, při níž jsou zásadní proteiny planární buněčné polarity (PCP) a signální kaskáda BMP (Cibois *et al.*, 2015; Ossipova *et al.*, 2015).

Ve stádiu pozdní neurulace (stádium 19) se tedy ve vnější vrstvě epidermis nacházejí tzv. „goblet“ buňky, mezi které jsou vmezeřeny prekurzory ionocytů a ciliárních buněk, které během stádií ocasního pupene (stádium 22 – 28) dozrávají a stávají se funkčními (Billett and Gould, 1971; Stubbs *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2007). Nedávno byl identifikován ještě další epidermální typ – malé sekreční buňky, u nichž se předpokládá, že se interkalují do vnější vrstvy epidermis (přibližně okolo stádium 27 - 30) podobně jako je tomu u ciliárních buněk a ionocytů (Obr. 4) (Dubaissi *et al.*, 2014; Walentek *et al.*, 2014).



Obr. 4 Vývoj embryonální epidermis drápatky vodní

(obrázky vývojových stádií převzaty z www.xenbase.org)

3.1.2.4 Buněčné typy embryonální epidermis

Zralá embryonální epidermis je ve vnější vrstvě složena ze čtyř buněčných typů – ionocytů, „goblet“ buněk, malých sekrečních buněk (SSCs) a multi-ciliárních buněk (MCCs). Vnitřní vrstva je tvořena bazálními buňkami, jejichž funkce není v současné době objasněna. Níže jsou uvedeny základní informace k jednotlivým buněčným typům vnější vrsty epidermis.

3.1.2.4.1 „Goblet“ buňky

Pod kontrolou BMP signalizace se vnější vrstva epidermis diferencuje do tzv. „goblet“ buněk, které tvoří majoritní podíl vnější vrstvy epidermis (Cibois *et al.*, 2015). Jedná se o sekreční buňky, které ve svých apikálně uložených váčcích obsahují epidermální lektin Xeel (Intelektin 2, itln2) a glykosaminoglykany (zejména Chondroitin-6-sulfát) (Billett and Gould, 1971; Nishikawa *et al.*, 1992; Nishikawa and Sasaki, 1993; Nagata *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2007). „Goblet“ buňky jsou součástí vrozené imunity embrya, jelikož produkce lektinu Xeel (která je zvýšená po vylíhnutí embrya) zajišťuje ochranu před patogeny z prostředí, na základě rozpoznání bakteriálního glykanu (Nagata, 2005; Wangkanont *et al.*, 2016).

3.1.2.4.2 Ionocyty

Jedná se o malé buňky interkalující do vnější vrstvy epidermis, kde je lze rozpoznat morfologicky (Billett and Gould, 1971; Stubbs *et al.*, 2006) nebo dle exprese specifických genů (Hayes *et al.*, 2007; Dubaissi and Papalopulu, 2011; Quigley *et al.*, 2011). K diferenciaci ionocytů dochází těsně po gastrulaci a je řízená zejména transkripčním faktorem Foxi1e. Ionocyty exprimují řadu genů ovlivňujících iontovou rovnováhu jako jsou protonové pumpy (H+ vATPasy), enzymy generující ionty (ca12, karbonická anhydráza) a iontové přenašeče (pendrin, monokarboxylátový přenašeč mct4) (Dubaissi and Papalopulu, 2011; Quigley *et al.*, 2011).

Díky různé intenzitě *foxi1e* v embryonální pokožce drápatky bylo zjištěno, že se jedná o heterogenní skupinu:

a) Ionocyty mohou být rozděleny do 2 skupin dle exprese *v1a* (*atp6v1a*, komponenta vakuolární protonové ATPasy) a *ca12*, kdy 30 % ionocytů exprimuje *v1a* spolu s *ca12*, zatímco 70 % exprimuje pouze *v1a* (Dubaissi and Papalopulu, 2011).

b) Díky podobnosti s ionocyty ledvin je lze rovněž rozdělit na subtypy α a β v závislosti na expresi H+ v-ATPasy. Subtyp α je typický expresí *ae1* a přítomností H+ v-ATPasy zejména v plazmatické membráně, zatímco subtyp β je charakteristický expresí pendrinu a lokalizací H+ v-ATPasy basolaterálně a v cytosolu buňky. Specifikace těchto subtypů nastává již ve fázi diferenciace pod kontrolou Notch signalizace, která reguluje transkripční faktor Ubp1. Ukázalo se, že Ubp1 potlačuje diferenciaci α-ionocytů zabráněním aktivace exprese ae1 (přes foxi1). Zároveň Ubp1 indukuje expresi pendrinu, což vede ke specifickému vývoji

β-ionocytů. V současné době není známý faktor, specificky ovlivňující tvorbu α-ionocytů (Quigley *et al.*, 2011). V tuto chvíli nelze určit, zda-li rozdělení ionocytů na subtypy α a β, souhlasí s rozdělením ionocytů dle exprese *v1a* a *ca12*.

Ionocyty jsou také zásadní pro vývoj MCCs. Ztráta ionocytů negativně ovlivňuje maturaci a funkci MCCs. V nepřítomnosti ionocytů se MCCs sice specifikují a interkalují do vnější vrsty epidermis, ovšem mají redukovaný počet cilií, které jsou kratší a špatně se pohybují. Díky tomu hrají ionocyty důležitou roli při vývoji funkčního mukociliárního epitelu (Dubaissi and Papalopulu, 2011).

3.1.2.4.3 Malé sekreční buňky (SSCs)

Teprve nedávno byl identifikován další epidermální typ – malé sekreční buňky (SSCs). SSCs jsou charakteristické svou malou velikostí a apikálně uloženými velkými váčky, obsahujícími serotonin a lektinový aglutinin (PNA – peanut agglutinin) (Dubaissi *et al.*, 2014; Walentek *et al.*, 2014). Serotonin je produkován na povrchu embrya, kde hraje významnou úlohu, jelikož chrání mukociliární epitel před bakteriálními infekcemi (Dubaissi *et al.*, 2014). Zároveň ovlivňuje pohyblivost cilií u MCCs, přes serotoninový receptor Htr3, který je exprimovaný na ciliích (Walentek *et al.*, 2014).

Vývoj SSCs je regulován transkripčním faktorem Foxa1, který je exprimován ve vnitřní epidermální vrstvě během časné neurulace (stádium 13 – 14). Do vnější vrstvy epidermis interkalují tyto buňky v pozdějších stádiích (stádium 27 – 30), než tomu je u ionocytů a MCCs (Dubaissi et al., 2014). Ukázalo se, že kromě transkripčního faktoru Foxa1, ovlivňuje specifikaci těchto buněk rovněž ATPasa (ATP4) přes kanonickou Wnt/β-katenin signální dráhu, která je ovšem podřízená Notch zprostředkované specifikaci a BMP signalizace, která je spojena s Delta/Notch dráhou (Cibois *et al.*, 2015; Walentek *et al.*, 2015). BMP signalizace je zásadní pro specifikaci epidermálních buněčných typů: aktivní BMP signalizace vede k tvorbě „goblet“ buněk, zatímco její útlum je nezbytný pro specifikaci ionocytů, SSCs ale také MCCs (Cibois *et al.*, 2015).

3.1.2.4.4 Multi-ciliární buňky (MCCs)

MCCs jsou buňky s velkým počtem apikálně lokalizovaných pohyblivých cilií na povrchu. Jednou ze zásadních funkcí MCCs je tvorba stálého směrovaného proudu tekutin. Pro směrovaný pohyb proudu je nezbytné, aby byly MCCs polarizované a to

jak na úrovni jednotlivých cilií v rámci jedné buňky, tak na tkáňové úrovni – vůči sousedním ciliárním buňkám v epitelu (Mitchell *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2009).

Ukázalo se, že v případě diferenciace MCCs je laterální inhibice zprostředkovaná Notch signalizací pod kontrolou miR-449. miR-449 specificky cílí a blokuje transkripci jak Notch receptoru, tak Dll1 ligandu, a tím umožňuje diferenciaci progenitorových ciliárních buněk (Marcet *et al.*, 2011).

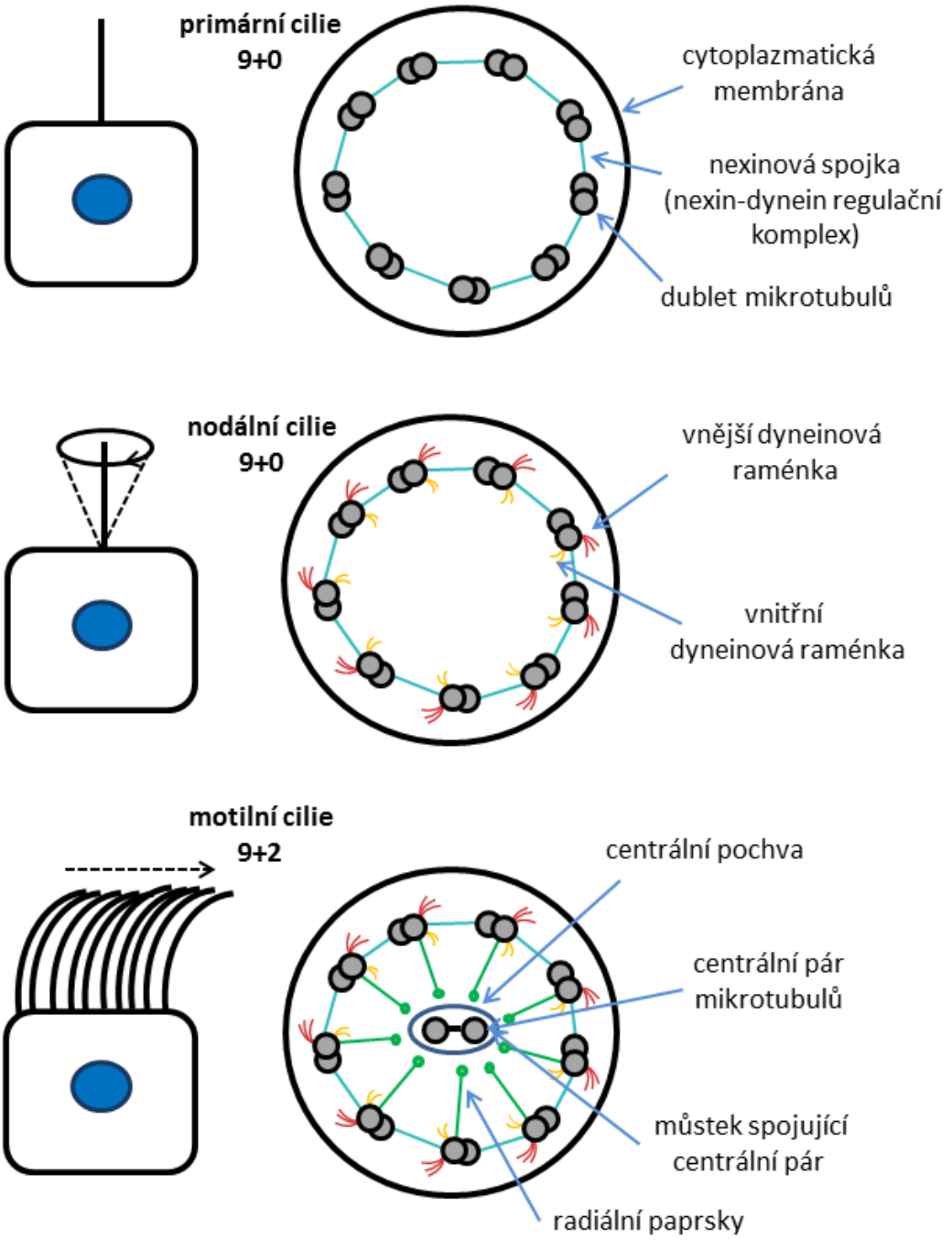
Jelikož ciliogeneze je složitý komplexní proces, zabývám se zevrubně touto problematikou v následující samostatné kapitole této práce.

3.2 Ciliární epitel

Součástí ciliárního epitelu, jak již název napovídá, jsou buňky mající na svém povrchu jednu či více cilií. Nacházejí se například v respiračním epitelu, pohlavním a močovém ústrojí nebo v hormonálním a nervovém systému. Tyto specializované buňky můžeme rozdělit do tří hlavních kategorií dle charakteru cilií: primární cilie, nodální cilie a motilní cilie.

Primární cilie je nepohyblivá buněčná struktura zajišťující zejména signální a senzorické funkce (například v ledvinách nebo ve zrakovém aparátu). Struktura primární cilie (9+0) je tvořena 9 páry mikrotubulů, bez centrálního páru či dyneinových ramének (Obr. 5) (Myklebust *et al.*, 1977; Roth *et al.*, 1988; Grisanti *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2016).

Nodální cilie byly považovány za speciální typ primárních cilií. Ukázalo se ovšem, že přestože majorita nodálních cilií má strukturu axonem 9+0 (podobnost s primárními ciliemi), jsou schopné pohybu díky dyneinovým raménkům (Obr. 5). Navíc byly objeveny nodální cilie se strukturou axonemy 9+2 a 9+4 (Sulik *et al.*, 1994; Nonaka *et al.*, 1998; Feistel and Blum, 2006; Odate *et al.*, 2016; Wallmeier *et al.*, 2016). Nodální cilie jsou nezbytné pro určení pravo-levé tělní osy v časných vývojových stádiích embrya (pomocí nezvykle cirkulujícího pohybu cilie) a nefunkčnost nodálních cilií vede například k závažnému syndromu *situs invertus* nepárových orgánů (Nonaka *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 1999; Nonaka *et al.*, 2002; Chen and Zhong, 2015).



Obr. 5 Struktura axonem primárních, nodálních a motilních cilií

Motilní cilie je stejně jako předchozí typy tvořena 9 páry mikrotubulů, na kterých jsou vnější a vnitřní dyneinová raménka (Obr. 5). Navíc se ve středu axonemy nachází tzv. centrální pár mikrotubulů (struktura 9+2), nezbytný pro motilitu cilií (Sorokin, 1968; Goodenough and Heuser, 1982; Rossman *et al.*, 1984). Motilní cilie jsou post-mitotické buňky, které se nacházejí ve spektru tkání – jako je respirační epitel, mozkové komory nebo vejcovody, kde se polarizovaně a synchronizovaně pohybují. Vytvářejí tím směrovaný proud pro pohyb částic podél epitelu, což například

respirační systém využívá jako jeden z obranných mechanismů (Meunier and Azimzadeh, 2016).

3.2.1 Multiciliogeneze

Multiciliogeneze je složitý komplexní proces, během něhož jsou na povrchu buňky vytvořeny cilie, které jsou ukotveny v buněčném povrchu pomocí tzv. bazálních tělísek (specializovaná forma centriol). V současné době není plně objasněn mechanismus multiciliogeneze na molekulární úrovni. Ovšem zásadním rozdílem mezi mono- a multi- ciliogenezí je, že v případě multiciliogeneze dochází ke generaci majority bazálních tělísek „*de novo*" tzv. acentriolární biogenezí (neboli deuterosomální cestou) ze struktury zvané deuterosom. Vytvořená bazální tělíska migrují z cytoplazmy k apikální membráně, kde ukotvuje a tvoří kotevní bod - základnu pro růst axonemy.

Proces multiciliogeneze lze rozdělit do několika fází: specifikace a diferenciace MCCs, namnožení bazálních tělísek, migrace a ukotvení bazálních tělísek (a s tím spojena tvorba axonemy) a polarizace (jak intracelulární, tak na tkáňové úrovni) (Obr. 6).

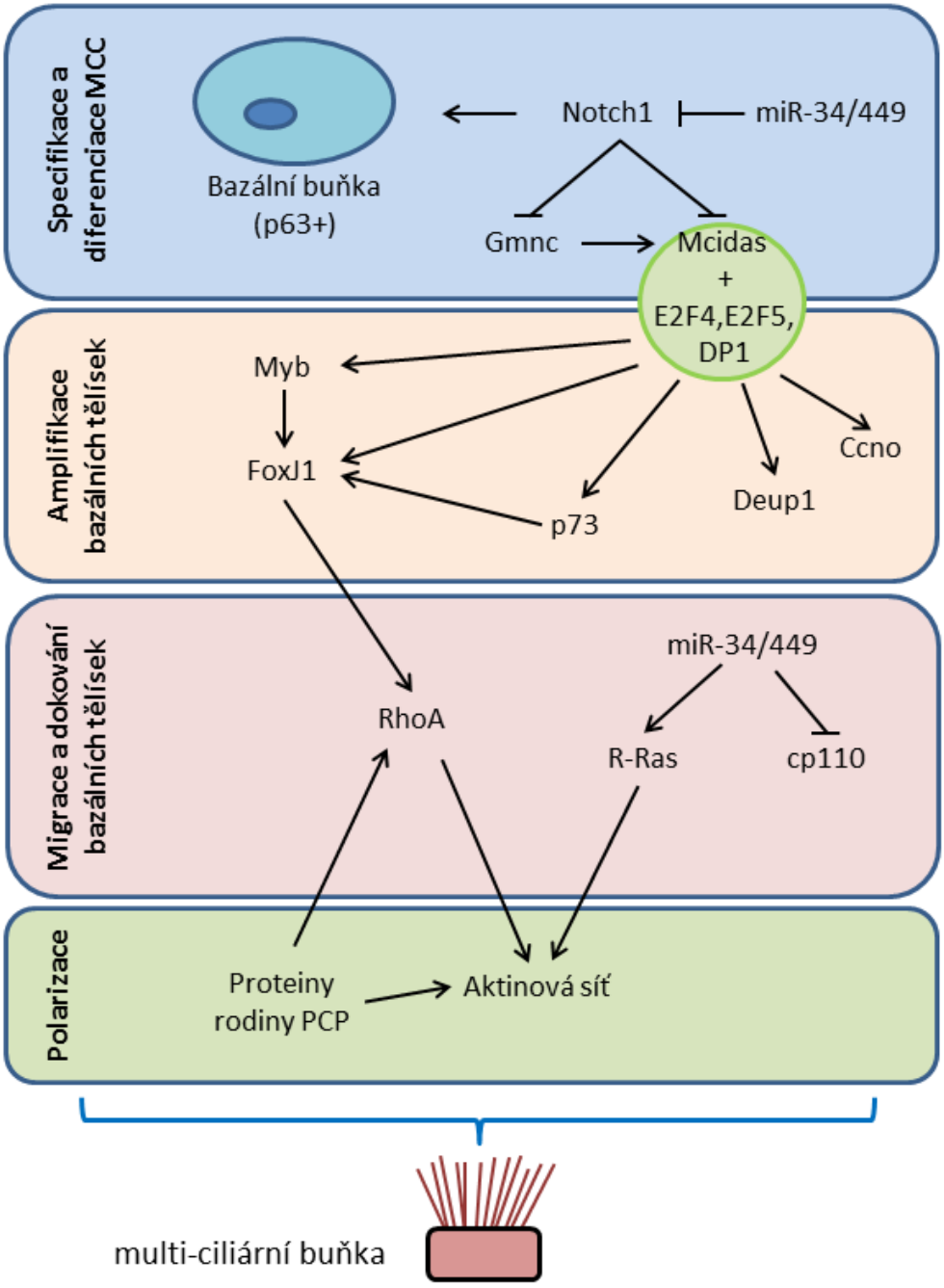
3.2.1.1 Specifikace a diferenciace MCCs

Obecně dochází ke specifikaci a diferenciaci MCCs buněk v časném stádiu vývoje z bazálních buněk (exprimující p63 a Sox2) pomocí laterální inhibice zprostředkované Notch signalizací pod kontrolou miR-449 (Marcet *et al.*, 2011).

Za hlavní regulátory specifikace a diferenciace MCCs jsou považovány Gmnc (známý také jako Gemc1, Geminin) a Mcidas (Multicilin), které ovlivňující výstup z buněčného cyklu a účastní se časné diferenciace MCCs. V současné době není plně objasněn mechanismus fungování těchto dvou faktorů, ovšem prokázalo se, že Mcidas může interagovat s Gmnc a exprese *mcidas* je pod kontrolou Notch signalizace – inhibice Notch signalizace vede k aktivaci exprese *mcidas,* což je nezbytné pro formování MCCs. Zároveň exprese *gmnc* předchází a je vyžadována pro expresi *mcidas* (Stubbs *et al.*, 2012; Kyrousi *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Arbi *et al.*, 2016).

Multicilin se rovněž specificky váže k transkripčním faktorům E2f4 a E2f5 (asociovány s geny buněčného cyklu), což vede k podpoře transkripce klíčových genů

multiciliogeneze, tvorbě komponent bazálních tělísek a pravděpodobně k indukci konečného programu diferenciace MCCs (Ma *et al.*, 2014).



Obr. 6 Zjednodušené schématické znázornění regulace multiciliogeneze

miR-34/449 inhibuje Notch signalizaci, což vede k expresi a aktivaci Mcidas, který se váže k transkripčním faktorům E2F4, (E2F5) a Dp1. Komplex Mcidas/E2F/Dp1 podporuje transkripci mnoha genů nezbytných pro multiciliogenezi, jako jsou *ccno*, *deup1*, *myb*, *foxJ1* nebo *p73*, které se podílí na namnožení bazálních tělísek. Transkripční faktor Foxj1 kontroluje tvorbu aktinové sítě přes GTPasu RhoA a k ativaci exprese FoxJ1 může dojít za pomoci transkripčního faktoru Myb, komplexem Mcidas/E2F/Dp1 nebo přímou aktivací proteinem p73. Tvorba aktinové sítě je zároveň regulována proteiny rodiny PCP (které mohou zprostředkovat aktivaci Rho GTPasy), nebo pomocí miR-34/449,

která inhibuje R-Ras (což umožňuje tvorbu apikální aktinové sítě) nebo umlčuje protein Cp110, který pokud je funkční, tak potlačuje tvorbu axonemy (Gomperts *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2009; Marcet *et al.*, 2011; Stubbs *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Boon *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014; Wallmeier *et al.*, 2014; Chevalier *et al.*, 2015; Kyrousi *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Arbi *et al.*, 2016; Marshall *et al.*, 2016).

3.2.1.2 Biogeneze bazálních tělísek

U dělících se buněk dochází k duplikaci centriol z již existujících mateřských centriol (Kuriyama and Borisy, 1981). Během přechodu z G1 do S fáze, dochází na proximálním konci mateřské centrioly k tvorbě komplexu Cep63/Cep152, který zahajuje biogenezi dceřiných centriol kolmo k mateřské (Brown *et al.*, 2013). Centrosomální protein Cep152 poté rekrutuje a aktivuje enzym Plk4 (klíčový regulátor pro iniciaci formování dceřiné centrioly), který stabilizuje protein Sas6 tvořící středovou strukturu tvořící se centrioly (Habedanck *et al.*, 2005; Firat-Karalar and Stearns, 2014).

Jelikož MCCs mají na svém apikálním povrchu desítky až stovky cilií, je nutná účinná amplifikace bazálních tělísek (centriol, tvořených devíti triplety mikrotubulů), což není možné pouze pomocí výše popsané kanonické dráhy duplikace centriol. Byly popsány 2 mechanismy tvorby bazálních tělísek – centriolární dráha a deuterosomální dráha, které oproti dělícím se buňkách fungují současně v G0 fázi. Centriolární dráhou vzniká minorita bazálních tělísek amplifikací z existujících centriol (stejně jako je tomu u dělících se buněk), zatímco deuterosomální dráhou vzniká většina bazálních tělísek v MCCs (považováno za *„de novo“* biogenezi) (Sorokin, 1968; Steinman, 1968).

Regulace procesu amplifikace bazálních tělísek není momentálně plně objasněna, ale za hlavní regulátor je považován Mcidas. Tento protein tvoří komplex Mcidas/E2F/Dp1, který aktivuje většinu genů nutných pro biogenezi centriol a zároveň podporuje deuterosomální dráhu aktivací Deup-1 (klíčový faktor pro masivní tvorbu bazálních tělísek, zatímco u centriolární dráhy je klíčovým faktorem jeho paralog Cep63) (Zhao *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014). Dalším důležitým faktorem podílejícím se na regulaci amplifikace bazálních tělísek se ukázal Ccno (Cyklin O), který je exprimovaný apikálně v cytoplazmě MCCs (Boon *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014; Wallmeier *et al.*, 2014). Ccno je pozitivně regulován komplexem Mcidas/E2F4 a jeho mutace nebo deplece vede k redukci množství cilií, bez ovlivnění motility zbývajících

vyvinutých cilií. Tento charakteristický fenotyp dysfunkce MCCs je způsoben narušením tvorby centriol přes deuterosomální dráhu (Boon *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014; Wallmeier *et al.*, 2014; Funk *et al.*, 2015). Proces amplifikace bazálních tělísek je také regulován transkripčním faktorem Myb, který je exprimovaný během časné fáze multiciliogeneze v mukociliárním epitelu, kde podporuje výstup z buněčného cyklu a amplifikaci bazálních tělísek, zatímco u maturovaných MCCs k jeho expresi nedochází. Tento transkripční faktor je regulovaný proteinem Mcidas a Notch signální kaskádou a aktivuje expresi *foxJ1*, který řídí ukotvení bazálních tělísek a motilitu cilií. Myb tedy kromě amplifikace bazálních tělísek ovlivňuje i další procesy multiciliogeneze skrz expresi *foxJ1* (Tan *et al.*, 2013).

Teprvne nedávno byly charakterizovány některé proteiny tvořící deuterosom jako je Plk4 a Cep152 (regulační proteiny duplikace centriol), Sas6 (základní strukturní protein centriol), které jsou součástí kanonické centriolární dráhy (Klos Dehring *et al.*, 2013). Navíc byly nalezeny proteiny specificky se nacházející pouze v deuterosomu – CCDC78 a Deup-1 (paralog Cep63), které umožňují vazbu proteinu Cep152 a Plk4, což je nezbytné pro aktivaci biogeneze bazálních tělísek (Klos Dehring *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Kromě sdílení některých zásadních proteinů nutných pro biogenezi bazálních tělísek/centriol v rámci centriolární a deuterosomální dráhy se ukázalo, že jsou tyto 2 dráhy úzce spjaty, jelikož se na tvorbě sférické struktury zvané deuterosom podílí dceřiná centrozomální centriola (Al Jord *et al.*, 2014). Toto propojení těchto drah naznačuje, že v rámci MCCs nedochází k biogenezi bazálních tělísek „*de novo*“.

3.2.1.3 Migrace a ukotvení bazálních tělísek

Po amplifikaci bazálních tělísek jak na deuterosomech, tak na centrosomálních centriolách, dochází k jejich prodlužování a migraci k apikální membráně, kde fůzují skrz váčky s apikálním povrchem buňky.

Migrace a ukotvení bazálních tělísek je závislé na tvorbě aktinové sítě, která je regulována více různými faktory jako jsou komponenty PCP signalizace, transkripční faktor FoxJ1 nebo miR-34/449 (Gomperts *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Chevalier *et al.*, 2015). Aktinová síť je tvořena v MCCs na dvou úrovních - apikálně a subapikálně. Apikální aktinová síť se formuje během interkalace MCCs do vnější vrstvy a dokují se zde bazální tělíska, zatímco subapikální síť je

složena z krátkých aktinových můstků spojující bazální tělíska jedné cilie s „pruhovaný kořenem“ sousední cilie (Werner *et al.*, 2011; Antoniades *et al.*, 2014).

Ukázalo se, že transkripční faktor FoxJ1 kontroluje tvorbu aktinové sítě pomocí regulátorů aktinu jako je Ezrin a aktivací malé GTPasy RhoA (Pan *et al.*, 2007). K aktivaci exprese *foxJ1* může dojít nejen pomocí transkripčního faktoru Myb, ale také přímou aktivací proteinem p73, který reguluje mnoho genů nezbytných pro multiciliogenezi (Tan *et al.*, 2013; Marshall *et al.*, 2016).

GTApasa RhoA je nezbytná pro remodelaci aktinu a její aktivace je regulována také proteiny rodiny PCP, mezi které patří Dishevelled (Dvl) nebo Inturnet (Intu). Protein Dvl a Intu specificky zprostředkovávají aktivaci Rho GTPasy v bazálních tělíscích, díky čemuž je umožněno ukotvení bazálních tělísek do apikální membrány. Ukotvení je zprostředkováno asociací s membránovými váčky a pro cílení těchto struktur apikálně je nezbytný právě protein Dvl (apikální lokalizace bazálních tělísek) a také protein Fuz (apikální cílení membránových váčků) (Park *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2009). Protein Dvl se navíc podílí na migrování bazálních tělísek, usnadněním fosforylace CapZIP (regulátor aktinu) pomocí MAPK kinázy ERK7, jelikož oba tyto proteiny váže. MAPK kináza ERK7 se ukázala jako zásadní pro migrování bazálních tělísek a ztráta této kinázy vede ke ztrátě apikálního aktinu, který je nezbytný pro správný průběh multiciliogeneze (Miyatake *et al.*, 2015).

Dalším zajímavým regulátorem aktinové sítě nezbytné pro ukotvení bazálních tělísek se ukázala být miR-34/449. MiR-34/449 v časných stádiích umožňuje diferenciaci MCCs inhibicí Notch dráhy (Marcet *et al.*, 2011). Během migrace a ukotvení bazálních tělísek se miR-34/449 váže na R-Ras, čímž umožňuje tvorbu apikální aktinové sítě. Zároveň podporuje přesun Filaminu A (protein vázající aktin) do blízkosti bazálních tělísek (Chevalier *et al.*, 2015). MiR-34/449 rovněž podporuje dozrávání a ukotvení bazálních tělísek přímou post-transkripční represí proteinu Cp110 (centriolární protein potlačující tvorbu axonemy) (Song *et al.*, 2014).

3.2.1.4 Orientace cilií a jejich motilita

Pro správné fungování ciliárního epitelu je nezbytná jeho polarizace jak na intracelulární úrovni, tak v rámci celé tkáně, což ovlivňuje zároveň jak jejich orientaci, tak motilitu cilií a jejich směrovaný pohyb. Klíčovým regulátorem polarity a orientace cilií v MCCs je organizace cytoskeletu, jelikož bazální tělíska jsou v těsném kontaktu

jak s aktinovou, tak mikrotubulární sítí (jak již bylo zmíněno výše). Dynamika aktinu je nezbytná zejména pro správné rozestupy a koordinaci polarity cilií na tkáňové úrovni zatímco cytoplazmatické mikrotubuly jsou nutné pro lokální koordinaci polarity mezi sousedními ciliemi v rámci buňky (Werner *et al.*, 2011).

Jak pro intracelulární polarizaci, tak pro polarizaci na tkáňové úrovni se ukázaly být zásadní proteiny související s PCP signalizací, jako jsou transmembránové proteiny Frizzled a Vangl2 koordinující orientaci sousedních buněk (Park *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008; Werner *et al.*, 2011; Vladar *et al.*, 2012; Vladar *et al.*, 2016). Mechanismus polarizace není zcela objasněna, ale je zřejmé že k ní dochází na základě asymetrické lokalizace proteinů jako je Frizzled, Vangl2 nebo Dvl (Mitchell *et al.*, 2009; Vladar *et al.*, 2012; Boutin *et al.*, 2014; Vladar *et al.*, 2016). Kromě PCP proteinů se do polarity MCCs zapojuje také Wnt signalizace, pravděpodobně přes interakci Dvl s Inversinem, který může fungovat jako molekulární přepínač kanonické a nekanonické Wnt signalizace (Simons *et al.*, 2005).

Ustálení orientace cilií je také zajištěno externími stimuly, kterými jsou hydrodynamické síly působící na cilie. Proud tekutin utváří zpětnovazebnou pozitivní smyčku zajišťující planární polaritu cilie a tím i směrovaný pohyb MCCs (Mitchell *et al.*, 2007; Guirao *et al.*, 2010).

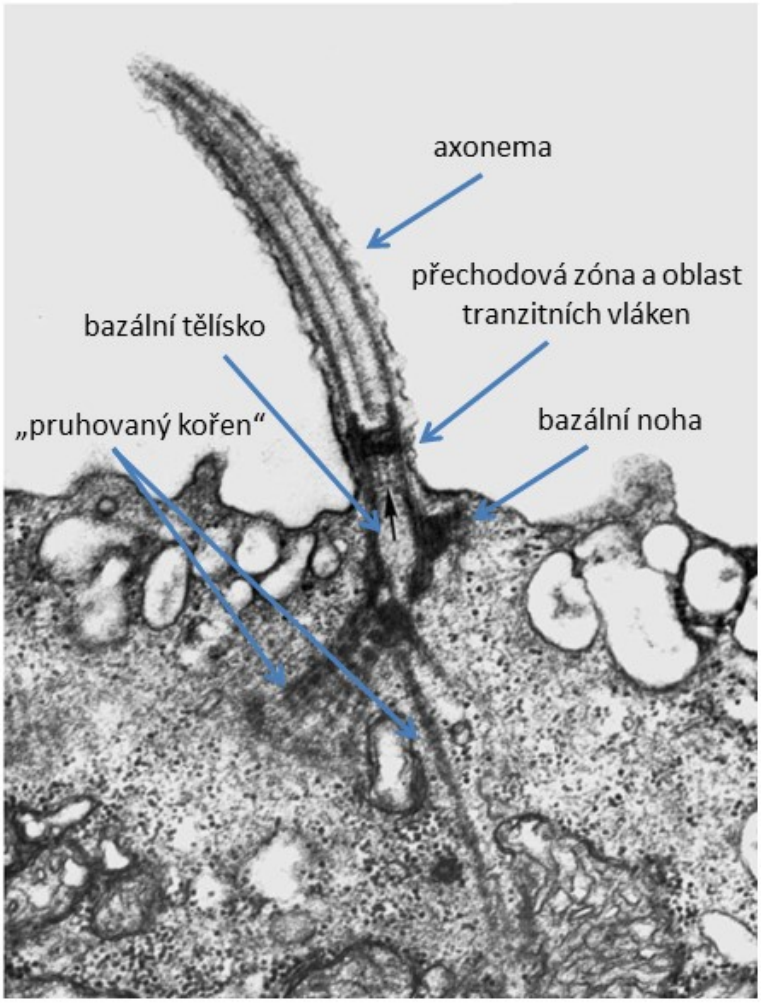
3.2.1.5 Struktura maturované cilie

Cilie je obecně složená z bazálního tělíska, ze kterého se prodlužuje axonema do extracelulárního prostoru. Bazální tělíska získávají během dozrávání přídatné struktury jako je bazální noha, oblast tranzitních vláken nebo „pruhovaný kořen“ (Obr. 7).

Bazální noha je lokalizovaná pod „přechodovou zónou“ a má funkci mikrotubuly organizujícího centra. „Pruhovaný kořen“ se nachází anteriorně od bazální nohy (o 180 °), prodlužuje se z bazálního tělíska a slouží jako strukturní opora cilie a určuje orientaci pohybu motilní cilie (Steinman, 1968; Anderson, 1972; Gordon, 1982; Odor and Blandau, 1985). Kromě strukturní opory je možné, že se „kořen“ podílí také na buněčné signalizaci, jelikož asociuje například s proteinem Dvl-2 nebo adhezivními proteiny jako je Fak, Vinkulin nebo Paxilin (Park *et al.*, 2008; Antoniades *et al.*, 2014; Antoniades *et al.*, 2017). „Přechodová zóna“ pravděpodobně reguluje jednotlivé membránové oddíly cilie a oblast tranzitních vláken působí jako spojka

mezi triplety mikrotubulů bazálního tělíska a ciliární membránou, a tím napomáhá apikálnímu ukotvení bazálních tělísek (Gordon, 1982; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011).

V bazální oblasti axonemy byl ještě objeven septinový prstenec (Kim *et al.*, 2010). Původně se domnívalo, že tento prstenec slouží jako difúzní bariéra (Hu *et al.*, 2010). Nedávno se ovšem ukázalo, že rozdílné septinové proteiny se mohou nacházet v různých axonemálních oblastech motilních cilií, což naznačuje jejich rozdílné funkce (Fliegauf *et al.*, 2014). Deplece těchto proteinů vede ke ztrátě nebo zkrácení cilií v rámci MCCs. Navís se ukázalo, že lokalizace septinů je pod kontrolou proteinu Fritz (Wdpcp, efektor PCP signální dráhy), který ovlivňuje multiciliogenezi a buněčný pohyb (Kim *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2015).



Obr. 7 Svislý průřez motilní cilií drápatky vodní

Svislý průřez embryonální epidermis drápatky vodní zobrazující jednotlivé komponenty motilní cilie drápatky vodní (převzato a upraveno ze Steinmann, 1968)

3.2.2 Lidský respirační mukociliární epitel

Dýchací soustava člověka se dělí na horní a dolní cesty dýchací, kdy horní cesty dýchací jsou složeny z dutiny nosní, hrtanu a hltanu a dolní cesty dýchací z průdušnice dělící se na průdušky (bronchy), které se rozdělují do průdušinek (bronchiol) a plicních sklípků (alveol). Mukociliární epitel se v rámci dýchací soustavy člověka nachází zejména v průduškách.

Průdušky mají hlavně protektivní funkci a jsou složeny z MCCs (50-70 %), bazálních buněk (30 %), „goblet“ buněk (25 %) Clara (Club) buněk (11 %) a neuroendokrinních buněk. MCCs se v respiračním epitelu synchronizovaně pohybují, čímž transportují cizorodé částice a hlen produkovaný plicním epitelem směrem ven z těla, a tím zabraňují hromadění hlenu v plicích a odstraňují cizorodé částice a patogeny z těla. Porucha struktury nebo funkce MCCs je charakteristickým rysem například syndromu primární ciliární dyskineze (PCD) (Knight and Holgate, 2003; Hessel *et al.*, 2014; Schamberger *et al.*, 2015). Bazální buňky se nacházejí pod epiteliálními buňkami a jsou v kontaktu s bazální membránou. Jsou považovány za kmenové buňky, ze kterých se mohou vyvinout stromální nebo cylindrické (sloupcové) epiteliální buňky a pravděpodobně mají významnou roli v regeneračních procesech plic (Baldwin, 1994; Knight and Holgate, 2003; Rock *et al.*, 2009). „Goblet“ buňky sekretují na povrch hlen (mucin 5AC), fungující jako ochrana plicního epitelu, která zároveň zachycuje cizorodé částice a patogeny. Abnormální sekrece mukózního materiálu může vyvolat respirační onemocnění jako je chronická bronchitida (Hovenberg *et al.*, 1996; Knight and Holgate, 2003). Clara buňky produkují v plicním epitelu uteroglobin a hrají roli během imunitní odpovědi organismu. Zároveň slouží jako progenitorové buňky, ze kterých se mohou stát jak buňky sekreční, tak MCCs (Knight and Holgate, 2003; Reynolds and Malkinson, 2010). Neuroendokrinní buňky jsou specializované buňky nacházející se buď samostatně, nebo v klastrech. Tyto buňky produkují bioaktivní látky jako je serotonin a pravděpodobně regulují různé biologické procesy, mezi které patří vývoj plicního epitelu nebo modulace imunitní odpovědi (Van Lommel, 2001; Knight and Holgate, 2003).

3.2.2.1 Embroynální epidermis drápatky vodní jako model pro studium lidského plicního epitelu a jeho defektů

Jak již bylo zmíněno, embryonální epidermis drápatky vodní je mukociliární epitel (stejně jako respirační epitel) složený z ionocytů, SSCs, „goblet“ buněk, MCCs a bazálních buněk (Stubbs *et al.*, 2006; Dubaissi and Papalopulu, 2011; Quigley *et al.*, 2011; Dubaissi *et al.*, 2014; Walentek *et al.*, 2014; Cibois *et al.*, 2015). Mukociliární epitel má 2 základní charakteristiky ve složení: přítomnost ciliárních buněk a přítomnost sekrečních buněk. Oba tyto buněčné typy jsou přítomny jak v embryononální epidermis drápatky vodní, tak v lidském respiračním epitelu. Oba typy epitelů sekretují mukus „goblet“ buňkami a ciliární buňky mají na apikálním povrchu velké množství cilií, které se koordinovaně pohybují (Steinman, 1968; Billett and Gould, 1971; Knight and Holgate, 2003).

Analogie těchto epitelů je kromě částečné morfologické podobnosti podpořena i na molekulární úrovni. Například u obou systémů je pro diferenciaci MCCs nezbytný transkripční faktor FoxJ1 (You *et al.*, 2004; Stubbs *et al.*, 2008), BMP signalizace zajišťuje vývoj mukociliárního epitelu (s rozdílem aktivity BMP u „goblet“ buněk) (Cibois *et al.*, 2015), specifikace a diferenciace MCCs je zajištěna laterální inhibicí zprostředkovanou Notch signalizací pod kontrolou miR-449 (Marcet *et al.*, 2011), pohyblivost cilií je ovlivněna přes serotoninový receptor Htr3 (Bayer *et al.*, 2007; Walentek *et al.*, 2014) nebo formování apikální sítě u MCCs ovlivňuje miR-34/449 přes R-Ras (Chevalier *et al.*, 2015). Také se ukázalo, že ATP4a je nezbytná pro vývoj a správné fungování MCCs a je možným vysvětlením výskytu pneumonií u jedinců léčených blokátory protonových pump (běžně používaných při terapii chronického refluxu nebo proti překyselení žaludku) cílících na ATP4 (Devault and Castell, 1999; Sachs *et al.*, 2007; Walentek *et al.*, 2015).

Z výše uvedených důvodů se ukazuje embryonální pokožka drápatky vodní jako vhodný model pro studium mukociliárních epitelií a jejich defektů, která může objasnit složité procesy vývoje a fungování této tkáně a výsledky mohou přispět k léčbě mnoha různých nejen plicních lidských onemocnění. Velkou výhodou ve srovnání s modelem lidských primárních bronchiálních epiteliálních buněk (PBEC), které jsou časově náročné na kultivaci (v řádu týdnů), je dostupnost mukociliárního epitelu drápatky vodní v řádu dní.

3.3 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je jednoduchý bezbarvý plyn, který byl dlouhou dobu považovaný pouze za zdraví škodlivý radikál. Teprve v roce 1980 byla objevena Robertem F. Furchgottem látka cévního epitelu, kterou pojmenoval jako endoteliální relaxační faktor (EDRF) a později se ukázalo, že se jedná právě o NO (Furchgott and Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Za objev NO, jakožto signální molekuly kardiovaskulárního systému, byla v roce 1998 udělena Nobelova cena Robertu F. Furchgottovi, Louisovi J. Ignarro a Feridu Muradovi. Ukázalo se, že se NO účastní mnoha biologických procesů jako je relaxace buněk hladké svaloviny, neurotransmise nebo imunitní odpovědi (Clough, 1999; Baranano *et al.*, 2001; Kellogg *et al.*, 2005).

Poločas rozpadu tohoto radikálu je pouze několik sekund, což omezuje jeho působení na delší vzdálenosti, přestože je schopný difundovat skrz buněčné membrány (Wood and Garthwaite, 1994; Hakim *et al.*, 1996; Subczynski *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2001; Nedeianu *et al.*, 2004).

NO je produkovaný zejména třemi syntázami NO (NOS), přeměnou L-argininu na L-citrulin za přítomnosti NADPH a kyslíku. Jedná se o dvě po sobě jdoucí reakce se vznikem meziproduktu N-hydroxy-L-argininu (Stuehr *et al.*, 1991; Knowles and Moncada, 1994). Ke vzniku NO může docházet také vlivem superoxidu na hydroxylamin nebo nezávisle na NOS, redukcí dusitanů (nitritů) na NO (Benjamin *et al.*, 1994; Vetrovsky *et al.*, 1996; Miyamoto *et al.*, 2011).

3.3.1 NO syntázy

Jak již bylo zmíněno, NO je produkovaný syntázami NO (NOS), které obsahují oxygenázovou (hemovou, N-konec) a reduktázovou (flavoproteinovou, C konec) doménu, které mohou být rozděleny motivem vázající kalmodulin. NO syntázy jsou aktivní pouze ve formě homodimerů a lze je rozdělit na konstitutivní a indukované. Mezi konstitutivní NOS patří neuronální NOS (nNOS, NOSI) a endoteliální NOS (eNOS, NOSIII), které jsou závislé na vápenatých iontech z důvodu jejich aktivace kalmodulinem. Indukovaná forma NOS (iNOS, NOSII) váže kalmodulin trvale, z toho důvodu není závislá na změnách hladiny vápenatých iontů (Mayer *et al.*, 1990; Hevel *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1992; White and Marletta, 1992).

Aktivita konstitutivních syntáz může být navíc regulována také fosforylacemi (pomocí kináz závislých na kalmodulinu jako je PKC nebo PAK), ale rovněž defosforylacemi (Nakane *et al.*, 1991; Dinerman *et al.*, 1994; Komeima *et al.*, 2000; Fulton *et al.*, 2005; Motley *et al.*, 2007). Obecně je aktivita NOS modulovaná přítomností kofaktorů jako je flavinadenindinukleotid (FAM), flavinmononukleotid (FMN), nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) nebo tetrahydrobiopterin (BH4) (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Garcin *et al.*, 2004; Daff, 2010).

nNOS

nNOS se vyskytuje zejména v cytosolu buňky, ale byla lokalizována také vázaná k membráně (přímo či přes adaptorové proteiny) nebo v jádře, což naznačuje různé funkce této syntázy dle její subcelulární lokalizace (Hecker *et al.*, 1994; Riefler and Firestein, 2001; Korzhevskii *et al.*, 2008). Aktivita nNOS může být ovlivněna zpětnovazebnou inhibicí pomocí NO, který se váže na hemovou strukturu nNOS a tím blokuje její aktivitu (Wang *et al.*, 1994). nNOS se nachází například v periferním a centrálním nervovém systému, kde moduluje zásadní funkce jako je synaptická plasticita, učení, paměť nebo neurogeneze (Huang *et al.*, 1993; Linares *et al.*, 2006; Toni *et al.*, 2015; Anaeigoudari *et al.*, 2016). Tato syntáza se také účastní procesu hojení kožního poranění (Boissel *et al.*, 2004), podílí se na kontrole zvýšené proliferace keratinocytů (Mendes *et al.*, 2012) a při mechanickém podráždění pokožky dochází ke zvýšené produkci NO skrz nNOS (Ikeyama *et al.*, 2010).

eNOS

eNOS je nejčastěji spojována s produkcí NO v rámci vazodilatace cév. Nachází se v cévním a plicním epitelu, trombocytech, kardiomyocytech nebo v buňkách hipokampu (Teichert *et al.*, 2000). Na buněčné úrovni je lokalizována zejména v plazmatické membráně (jak asociována s kaveolami, tak bez nich), ovšem rovněž se nachází v jádře, golgiho aparátu nebo cytosolu buňky (Giordano *et al.*, 2002; Minshall *et al.*, 2003; Fulton *et al.*, 2004; Gobeil *et al.*, 2006). eNOS může být aktivována různými externími stimuly jako je například VEGF. Signály vedoucí k aktivaci a fosforylaci eNOS jsou přenášeny skrz různé membránové domény v endotelových buňkách (Tran *et al.*, 2016). Ukázalo se, že aktivita eNOS je modulována jak post-transkripčními modifikacemi, tak proteinovými interakcemi (např. pomocí Akt1, kaveloinu) (Lee *et al.*, 2018). Dysfunkce eNOS vede k různým cévním

a metabolickým poruchám a je spojována také s hypoxickou ischemickou encefalopatií (Huang *et al.*, 1995; Thum *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2010).

iNOS

Během zánětlivých procesů v organismu byla detekována zvýšená produkce iNOS, která je indukovaná například cytokiny, což ukazuje její roli během imunitní odpovědi organismu (Geller *et al.*, 1993b; Melillo *et al.*, 1995). iNOS se nachází zejména v makrofázích, ovšem je přítomná rovněž v astrocytech, mikrogliích, hepatocytech, kardiomyocytech nebo endoteliálních buňkách (Xie *et al.*, 1992; Geller *et al.*, 1993a; Balligand *et al.*, 1994; Galea *et al.*, 1994). Na subcelulární úrovni se iNOS nachází jak v plazmatické membráně, tak v cytosolu buňky. Navíc byla lokalizována v peroxisomech hepatocytů (Tojo *et al.*, 1994; Stolz *et al.*, 2002). V organismu se uplatňuje zejména během imunitní odpovědi (jak fyziologicky, tak patofyziologicky) (Flynn *et al.*, 1995; Serbina *et al.*, 2003; Conti *et al.*, 2004). Regulace aktivity iNOS se odehrává zejména na transkripční úrovni například pomocí NF-κB, AP-1 nebo IRF-1 (Martin *et al.*, 1994; Kleinert *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1998).

3.3.2 Působení NO v organismu

NO může v organismu působit jak příznivě, tak toxicky. Fyziologické účinky NO jsou spojovány s nízkými koncentracemi NO, mající za následek například vazodilataci cév nebo neurotransmisi. Zvýšené koncentrace NO se pojí s obranným a cytotoxickým působením NO na organismus, jelikož dochází k tvorbě reaktivních molekul, jako jsou stabilní nitrosothioly nebo peroxinitrit, který poškozuje tkáň nitratací bílkovin.

NO reguluje různé biologické funkce nejčastěji přes sGC-cGMP-PKG signalizační kaskádu, kdy dochází k aktivaci solubilní guanylátcyklásy (sGC, heterodimer) reakcí NO s její hemovou skupinou. Aktivní sGC katalyzuje přeměnu GTP na cyklický GMP (cGMP), který v buňce zajišťuje řadu funkcí, zejména aktivaci proteinkinázy G (PKG), která fosforyluje mnoho transkripčních faktorů, čímž ovlivňuje nezměrné množství dalších buněčných procesů (Arnold *et al.*, 1977; Loweth *et al.*, 1997; Hood and Granger, 1998; Sauzeau *et al.*, 2003; Francis *et al.*, 2010). NO může v organismu také působit nezávisle na cGMP (Salvemini *et al.*, 1993; Bolotina *et al.*, 1994). Jedná se například o S-nitrosylace nebo nitrace tyrozinových

a tryptofanových reziduí (Stamler *et al.*, 1992; Alvarez *et al.*, 1996; Ischiropoulos, 1998; O'donnell *et al.*, 1999). Díky velké afinitě NO k hemu a reakcí se superoxidem, dochází k jeho inaktivaci (Hakim *et al.*, 1996). Navíc se reakcí NO se superoxidem tvoří peroxynitrit, který v organismu působí patologicky (Blough and Zafiriou, 1985; Beckman *et al.*, 1990).

V organismu ovlivňuje NO celou řadu biologických procesů. Výzkum na různých modelových organismech ukázal, že NO reguluje během vývoje drosofily a drápatky vodní buněčnou proliferaci (Kuzin *et al.*, 1996; Peunova *et al.*, 2007). Produkce NO je také důležitá pro embryonální vývoj myši (Gouge *et al.*, 1998) a může mít zásadní roli při zrání oocytů a během embryogeneze (Sengoku *et al.*, 2001). NO má zásadní vliv na vývoj myšího srdce a deficience eNOS vede k výrazné postnatální úmrtnosti (Feng *et al.*, 2002). Nedávné studie ukázaly, že NO je produkovaný v embryonální epidermis drápatky vodní a je nezbytný pro vývoj úst a neurální lišty (Jacox *et al.*, 2014; Tomankova *et al.*, 2017). Rovněž se ukázalo, že NO tlumí epiteliálně-mezenchymální tranzici v alveolárních potkaních buňkách, čímž zabraňuje transformaci alveolárních epiteliálních buněk na myofibroblasty (Vyas-Read *et al.*, 2007) a v potkaním a králičím plicním epitelu zvyšuje frekvenci kmitání cilií (Li *et al.*, 2000; Jiao *et al.*, 2010). Kromě živočišné říše má NO také zásadní biologický vliv v rostliné říši, kde je nezbytný například pro tvorbu kořenů (Lombardo *et al.*, 2006).

4 Materiál a metody

4.1 Modelový organismus a manipulace s embryi

4.1.1 Pokusná zvířata

K pokusům byli využiti jedinci druhu *Xenopus laevis* (drápatka vodní), jejichž chov je zaveden v rámci Biotechnologického ústavu AVČR. Jedinci pro zavedení chovu byli zakoupeni v European Xenopus Resource Centre (EXRC) Anglie. Modelový organismus je chován ve velkých plastových kádích po 10 – 15 kusech. Pro chov je využívána filtrovaná kohoutková voda s přídavkem mořské soli a FMC (Dajana). Krmení žab probíhá 2x týdně, čištění kádí 4x do týdne. Péče a používání pokusných zvířat spolu s pokusy vyhovují všem institucionálním a vnitrostátním právním předpisům o dobrých životních podmínkách zvířat.

4.1.2 Kultivace a manipulace s embryi drápatky vodní

Samicím drápatky vodní bylo pro stimulaci ovulace injekčně podáno 400 IU lidského choriového gonadotropinu (hCG, sigma-aldrich, C1063). Vajíčka drápatky vodní byla jemnou masáží získána ze samic, *in vitro* oplodněna, odblaněna roztokem cysteinu (2% cystein, pH 7.5 upraveno 5M NaOH) a kultivována v 0.1x MBS (Modified Barths Saline: 8.8 mM NaCl, 0.1 mM KCl, 0.5 mM HEPES pH 7.8, 0.07 mM $CaCl_2$, 0.1 mM $MgSO_4$, 0.25 mM $NaHCO_3$) + gentamicin (20 µg/ml) do stádia 10 – 40. Stádium embryí bylo určeno dle zavedeného systému Nieuwkoop and Faber (1994). Embrya pro imunohistochemické analýzy byla fixována v 4% paraformaldehydu (PFA).

4.1.3 Použití chemických donorů a inhibitorů NO signalizace

SNAP (donor oxidu dusnatého, S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine, Sigma-Aldrich N3398) byl rozpuštěn v DMSO na 100 mM koncentraci a uskladněn v -80 °C. Do oplozeného vajíčka byl injikován 1 nl donoru SNAP a embrya ve stádiu 30 byla fixována ve 4% PFA a následně využita pro imunohistochemickou analýzu.

Inhibitor NO syntáz **TRIM** (1-(2-Trifluoromethylphenyl) imidazole, Sigma-Aldrich T7313) byl rozpuštěn v DMSO na 1 M koncentraci. Embrya ve stádiích 10, 15 a 18 byla inkubována v 0.1x MBS médiu s 2 mM inhibitorem TRIM (2 µl

TRIM/1 ml 0.1x MBS) při pokojové teplotě do stádia 26. Embrya byla využita pro RT-qPCR analýzu a fixována ve 4% PFA pro imunohistochemickou analýzu.

Inhibitor guanylátcyklázy **ODQ** (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, Sigma-Aldrich O3636) byl rozpuštěn v DMSO na koncentraci 100 mM. Embrya ve stádiu 10 byla inkubována v 0.2 mM ODQ rozpuštěném v 0.1x MBS médiu v pokojové teplotě do stádia 26. Embrya byla fixována ve 4% PFA a využita pro imunohistochemickou analýzu.

4.1.4 Morpholino oligonukleotidy

Morpholino oligonukleotidy (MO) jsou krátké syntetické molekuly podobné primerům, které se váží na start kodón nebo exon-intron přechod, a tím blokují translaci nebo správný sestřih cílového genu. Všechny MO byly zakoupeny z Gene Tools, LLC (Philomath, OR, USA). Standartně používané kontrolní MO navržené firmou Gene Tools bylo používáno pro kontrolní injikaci vždy ve stejné koncentraci jako studované MO. MO byly injikovány do oplozeného vajíčka v koncentraci: *nNOS* MO 17 ng a 34 ng, *eNOS* MO 34 ng, *notch1* MO 17 ng, *prkg1* MO 17 ng, 34 ng a 51 ng a paralelně bylo injikováno odpovídající množství kontrolního MO.

Sekvence *nNOS* MO byla získaná z Jacox et al. (2014) (5′-TGGCTAAAAGAACACAGGACATCAA-3′), zatímco sekvence *notch1* MO byla získaná z www.xenbase.org (5′-GCACAGCCAGCCCTATCCGATCCAT-3′). *eNOS* MO a *prkg1* MO (pro α a β variantu) byly navrženy a testovány před samotnými experimenty. Jako nejvíce účinná se ukázala sekvence 5′-TTCAGCTTCAATGCTCATACCTGCC-3′ pro *prkg1* MO a sekvence 5′-AAAAGCCAAGCACTACTCACCGTTT-3′ pro *eNOS* MO.

4.2 Mikroskopické techniky

4.2.1 Barvení NO

Vzorky byly kultivovány v indikátoru NO: 4-Amino-5-Methylamino-2′:7′-Difluorofluorescein Diacetate (1:150), (DAF-FM DA, Life Technologies D-23842) společně s indikátorem NO: 5,6-Diaminofluorescein diacetate (1:150) (DAF-2DA, Cayman 85165). Inkubace probíhala 30 min při pokojové těplotě a následně byly vzorky fixovány v 4% PFA (1 hodinu při pokojové teplotě nebo ve 4 °C přes noc). Část fixovaných embryí byla následně barvena pomocí primárních protilátek proti

α-tubulinu (1:1000, Sigma-Aldrich T9026), serotoninu (5HT) (1:500, Merck Millipore AB938) nebo s DAPI (1:10 000, Sigma-Aldrich 32670-MG-F) (viz. 4.2.2).

Vzorky byly nafoceny konfokálním mikroskopem (Carl Zeiss LSM 880 NLO) v rámci servisního pracoviště Zobrazovací metody BIOCEV nebo fluorescenčním makroskopem (Leica MZFL III). Získaná data byla analyzována pomocí NIS elements (D4.20.01), ZEN lite softwaru (2.1), ImageJ (NIH, verze 1.42q) a Photoshopu (Adobe, verze 11.0).

4.2.2 Imunohistochemická barvení

Odblaněná embrya byla fixovaná pomocí 4% PFA přes noc, 3x promyta v PBT po dobu 15 min a pro pozdější analýzy uskladněna v 100% methanolu (MeOH) v -20 °C. Před barvením byla embrya promyta roztokem PBT 3x 10 min. Embrya byla inkubována s primární protilátkou (viz. Tab. 1) přes noc ve 4 °C v barvícím médiu (PBS+0.1% Tween 20, 0.1% Triton X, 0.1% BSA + 1% kozí sérum) a poté promyta roztokem PBT 3x 10 min. Následně byla embrya inkubována přes noc ve 4 °C v barvícím médiu se sekundární protilátkou (viz. tabulka níže) a poté promyta roztokem PBT 3x 10 min. Pomocí DAPI (1:10 000, 10 min, pokojová teplota) v roztoku PBT byla nabarvena jádra a přebytečná barva byla odmyta roztokem PBT 3x 10 min při pokojové teplotě. Embrya byla montována na podložní skla do Aqua-poly/mount (Polysciences, 18606) a focena konfokálním mikroskopem (Carl Zeiss LSM 880 NLO) v rámci servisního pracoviště Zobrazovací metody BIOCEV. Získaná data byla analyzována pomocí ZEN lite softwaru (2.1), ImageJ (NIH, verze 1.42q) a Photoshop (Adobe, verze 11.0).

primární protilátka	ředění	firma	sekundární protilátka
monoklonální α-tubulin	1:1000	Sigma-Aldrich T9026	M, 1:500
monoklonální gamma-tubulin	1:1000	Sigma-Aldrich T6557	M, 1:250
polyklonální serotonin (5HT)	1:500	Merck Millipore AB938	R, 1:250
phalloidin (alexa fluor 488)	1:1000	Life Technologies A12379	-
polyklonální nNOS	1:200	Enzo Life Sciences, BML-SA227-0100	R, 1:500
polyklonální eNOS	1:200	Thermo Fisher Scientific PA3-031A	R, 1:500
DAPI	1:10 000	Sigma-Aldrich 32670-MG-F	-
sekundární protilátka			
Alexa 488 goat anti-mouse		Life technologies A11001	
Alexa 647 goat anti-rabbit		Life technologies A21244	
Alexa 647 goat anti-mouse		Life Technologies A21235	

Tab. 1 Použité primární a sekundární protilátky

4.2.3 Příprava vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM)

Odblaněná embrya byla přes noc fixována v Karnowskiho roztoku, promyta 1x v PBS po dobu 10 min a dehydratována alkoholovou (ethanolovou) řadou (25, 50, 70, 80, 96 a 100% EtOH). Každý krok alkoholové řady byl nejméně po dobu 10 min. Následně byly vzorky zbaveny zbytků tekutin metodou vysoušení pomocí kritického bodu (provedl RNDr. Miroslav Hyliš, PhD) a embrya byla pomocí oboustrané lepící pásky připevněna na kovové nosiče. Takto připravené vzorky byly pozlaceny (provedl RNDr. Miroslav Hyliš, PhD) a snímány skenovacím elektronovým mikroskopem JEOL 6380 LV. Analýza dat byla provedena pomocí ImageJ (NIH, verze 1.42q).

4.2.4 Barvení kolagenů

Příprava vzorků:

Embrya byla fixována v 4% PFA po dobu 24 hodin. Poté byla promyta v PBS (3x 15 min) a dehydratována EtOH řadou (25%, 50%, 70%) – každý krok nejméně hodinu. Dehydratovaná embrya byla zalita do parafínových bločků (servisní pracoviště Ústavu Molekulární Genetiky) a na rotačním mikrotomu Leica RM2255 byly připraveny 10 μm parafínové příčné řezy, které byly následně odparafínovány

(xylén 3x 5 min, 100% EtOH 5 min, 90% EtOH 5 min, 70% EtOH 5 min, destilovaná H_2O).

Barvení (Massonův trichrome Sigma-Aldrich, HT15**):**

Odparafínované řezy byly barveny fuchsinem po dobu 5 min, opláchnuty v deionizované vodě a poté inkubovány v pracovním roztoku kyseliny fosfowolframové/fosfomolybdenové po dobu 5 min. Řezy byly přesunuty do anilinové modři na dobu 5 min a poté do 1% kyseliny octové na dobu 2 min. Po nabarvení byly vzorky propláchnuty deionizovanou vodou, dehydratované EtOH řadou (80% EtOH omáchání, 90% EtOH omáchání, 96% EtOH omáchání, 100% EtOH minimálně 5 min) a vyčistěny xylénem (2x 3 min). Nachystané řezy byly připraveny v Depexu (Sigma-aldrich, 44581) a foceny na mikroskopu (Nikon Eclipse 50i).

4.3 Studium genové exprese

4.3.1 Sběr embryonální epidermis

Embrya ve stádiu 26 byla usmrcena inkubací v 0.05% roztoku Benzocainu (Sigma-aldrich, E1501) a přenesena do roztoku papainu (Merc millipore, L2223) pro uvolnění buněčné adhesivity, kde byla pomocí pinzet po 2 minutách manuálně odebrána epidermis, která byla přenesena do 1 ml TRI Reagentu (Sigma-Aldrich, T9424) a zamražena v - 80 °C pro následnou izolaci RNA.

4.3.2 Izolace RNA

4.3.2.1 Fenol-chloroformovou extrakcí

Ze vzorků byla izolována celková RNA metodou fenol-chloroformové extrakce použitím komerčního TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, T9424) dle pokynů výrobce. Ze vzorků RNA byla eliminována DNA kontaminace pomocí DNase I kitu (Sigma-Aldrich, AMPD1-1KT). Vzorky byly inkubovány s DNasou 30 min ve 37 °C. Následně byla RNA přečistěna precipitací 8M lithium chloridem (LiCl, Sigma-Aldrich, L7026) v poměru 1:1 (LiCl:H2O) s přídavkem glykogenu (1 µl/vzorek, Sigma-Aldrich G1767) pro zvýšení výtěžku RNA. Koncentrace RNA byla měřena na spektrofotometru (Nanodrop 2000).

Protokol:

Vzorky byly mechanicky (propipetováním a vortexováním) homogenizovány v 1 ml TRI reagentu a 5 min inkubovány v pokojové teplotě. Ke vzorkům bylo přidáno 0.2 ml chloroformu a zkumavky byly po dobu 15 sekund jemně protřepány. Následně byly vzorky 15 min inkubovány v pokojové teplotě (po 5 min byly opětovně jemně protřepány) a poté centrifugovány (12 000 x g 15 min ve 2-4 °C).

Vrchní vodní fáze obsahující **RNA** byla odebrána do nových zkumavek a po přidání 0.5 ml isopropanolu byly vzorky jemně protřepány. Vzorky byly inkubovány 10 min při pokojové teplotě a poté centrifugovány (12 000 x g 10 min 2-4 °C). Supernatant byl odstraněn a RNA pelety byly promyty 1 ml 75% EtOH. Zbylý EtOH byl odstraněn centrifugací s otevřenými víčky (12 000 x g 2-4 °C 10 min). Poté byly vzorky DNasovány (jeden vzorek: 4 µl Dnasa I, 4 µl pufru, 32 µl vody) po dobu 30 min při 37 °C. RNA byla rozpuštěna v 40 µl vody bez nukleáz (NFW) a precipitována přidáním 40 µl 8M LiCl s přídavkem glykogenu (1 µl/vzorek). Vzorky byly inkubovány přes noc v -20 °C a poté centrifugovány (20 min, max. otáčky, 2-4 °C). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, vzorky byly promyty 1 ml 75 % EtOH a centrifugovány (10-30 min, 2-4 °C, max. otáčky). Supernatant byl opět odstraněn a zbylý EtOH se nechal odpařit. RNA pelety byly rozpuštěny ve NFW a koncentrace RNA byla určena spektrofotometricky na přístroji Nanodrop 2000. Vzorky byly uskladněny v -80 °C.

4.3.2.2 Qiagen Micro Kitem

Z embryí drápatky vodní byla pomocí RNeasy Micro Kitu (Qiagen, 74004) izolována celková RNA, která byla použita na přípravu knihoven pro RNA-Seq (viz. 4.3.3). Ze vzorků RNA byla eliminována DNA kontaminace pomocí DNase I kitu (Sigma-Aldrich, AMPD1-1KT). Vzorky byly inkubovány s DNasou 30 min ve 37 °C. Koncentrace RNA byla měřena na spektrofotometru (Nanodrop 2000).

Protokol:

Embrya byla mechanicky (propipetováním a vortexováním) homogenizována v 350 µl pufru RLT s přídavkem β-merkaptoethanolu (1 ml RLT pufru/10 µl β-merkaptoethanolu) a centrifugována (max. otáčky, 3 min). Supernatant byl přesunut do nových zkumavek s 350 µl 70% EtOH a opatrně promíchán. Následně byly vzorky

přesunuty na kolonky, které byly vloženy do 2 ml zkumavek a centrifugovány (8000 x g 15 s). Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a na kolonku bylo naneseno 350 µl pufru RW1 na promytí membrány s následnou centrifugací (8000 x g 15 s) a odstraněním supernatantu. Na kolonku byla nanesena DNasa I a inkubována 30 min při 37 °C (na vzorek: 4 µl Dnasa I, 4 µl pufru, 32 µl H2O). Poté bylo na kolonku opět naneseno 350 µl pufru RW1 a vzorky byly centrifugovány (8000 x g 15 s) a supernatant byl odstraněn. Kolonky byly přemístěny do nových 2 ml zkumavek, na kolonky bylo naneseno 500 µl pufru RPE, byly centrifugovány (8000 x g 15 s) a supernatant byl odstraněn. Poté bylo na kolonky naneseno 500 µl 80% EtOH, vzorky byly centrifugovány (8000 x g 2 min) a supernatant byl odstraněn. Pro odstranění zbytků EtOH byly kolonky přemístěny do nových 2 ml zkumavek a centrifugovány (max. otáčky, 5 min) s otevřenými víčky. Supernatant byl odstraněn a RNA byla eluována do 30 µl NFW. Koncentrace RNA byla určena spektrofotometricky na přístroji Nanodrop 2000 a vzorky byly uskladněny v -80 °C.

4.3.3 Stanovení genové exprese u embryí se zablokovanou produkcí NO během vývoje pomocí RNA-Seq

Příprava vzorků:

Do oplozených vajíček bylo injikováno 17 ng směsi *eNOS* MO + *nNOS* MO (1:1) nebo 17 ng kontrolního MO. Embrya ve stádiu 26 byla po 3 kusech sbírána do 350 µl pufru RLT s přídavkem β-merkaptoethanolu, homogenizována vortexováním a až do izolace RNA uchována v -80 °C. Pro každou podmínku byl vytvořen biologický triplikát. RNA byla izolována pomocí Qiagen Micro kitu (viz. 4.3.2.2), finální RNA byla eluována do 30 µl NFW a koncentrace byla měřena spektrofotometricky na Nanodropu 2000. Kvalita RNA byla stanovena pomocí Experion High sense chip (Biorad, 7007105). Jelikož integrita a kvalita RNA je pro stanovení genové exprese nezbytná, zabývala jsem se touto problematikou v rámci jiného projektu v Laboratoři Genové exprese (Sidova *et al.*, 2015b).

Vzorky byly odeslány na přípravu knihoven a sekvenování do EMBL GeneCore v Heidelbergu. Na poly-A selekci byl použit 1 µg celkové RNA a knihovna byla připravena Illumina TruSeq RNA Library Preparation Kit v2 (Illumina, RS-122-2001). Knihovny byly spojené v ekvimolárním poměru a sekvenované v 50 bp paired-end módu s využitím přístroje Illumina HiSeq 2500.

Analýza dat

Data byla analyzována pomocí dostupných akademických programů Ing. Pavlem Abaffym. V prvním kroku byly pomocí TrimmomaticPE verze 0.35 (Bolger *et al.*, 2014) odfiltrované nízko-kvalitní čtení a adaptorové sekvence s použitím parametrů: „ILLUMINACLIP:TruSeq-PE.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36“. Ze zbývajících dat byla odfiltrována ribosomální RNA pomocí SorteMeRNA verze 2.0, (Kopylova *et al.*, 2012). Pomocí STAR verze 2.4.2a, (Dobin *et al.*, 2013) bylo mapováno finální čtení vůči genomu *Xenopus laevis* verze 9.1 (www.xenbase.org). Použitím htseq-count verze 1.8.0, (Anders *et al.*, 2013) byla generována tabulka s počtem čtení pro jednotlivé transkripty. Rozdílně exprimované geny (DEGy) byly identifikovány pomocí DESeq2 verze 1.18.1, (Love *et al.*, 2014). Jako DEGy byly vybrány geny s alespoň dvojnásobně rozdílnou expresí mezi jednotlivými podmínkami (absolutní hodnota log2FoldChange větší než 1) a současně adjustovanou p-hodnotou menší než 0.1. Získaná data byla potvrzena RT-qPCR.

4.3.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR)

Vzorky RNA uskladněné v -80 °C byly naředěny na stejnou koncentraci. Reverzní transkripce byla provedena pomocí Superscript III reverzní transkriptázy (Invitrogen™, 18080093) za použití 100 ng celkové RNA na přístroji C1000™ Thermal cycler (Bio-Rad). Pro kontrolu inhibice reakce reverzní transkripce byla použita univerzální RNA spike kontrola I (TATAA Biocenter). cDNA byla 5x ředěna v NFW.

Podmínky reakce: 75 °C for 5 min, 25 °C for 20 s, 4 °C for 2 min, 25 °C for 5 min, 50 °C for 60 min, 55 °C for 15 min, 75 °C for 15 min.

Reakční směs 1: 5 µl 100 ng RNA rozpuštěné v NFW, 0.5 µl 50µM náhodných hexamerů + oligo dT, 0.5 µl 10 mM dNTP, 0.5 µl spike RNA

Reakční směs 2 (přidána po schlazení vzorků na 4 °C): 2 µl pufru, 0.5 µl DTT, 0.5 µl RNAsout, 0.5 µl reverzní transkriptázy (Superscript III)

RT-qPCR analýza byla provedena na přístroji C1000™ Thermal Cycler CFX384™ Real-time system nebo CFX96™ Real-time system (Bio-Rad) za použití iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1708880). Biologický triplikát byl použit pro

každou podmínku, včetně negativní kontroly (reakce bez cDNA, odhalení primer-dimerů nebo kontaminované NFW), kontroly genomické kontaminace gDNA (vybraný biologický vzorek, který během reverzní transkripce neobsahoval reverzní transkriptázu) a kontroly inhibice reakce reverzní transkripce (spike kontrola).

Podmínky reakce: počáteční denaturace 95 °C 3 min, 40 cyklů: denaturace 95 °C 15 s, hybridizace 60 °C 20 s, prodlužování 72 °C 20 s, následováno meltingovou křivkou.

Reakční směs: 2 µl naředěné cDNA, 0.5 µl 10 µM F+R primerů, 2.5 µl NFW, 5 µl iQ™ SYBR Green Supermixu

drápatka vodní	forward	reverse
actb	CGTCCAACCCTCAGATCACA	TCTTTTTGTCCCATTCCAACCA
bbof1 L	GCAAAGCTCCACTTACTCCAA	TGACGTTCTGTTGTAACTCCTG
bgn	TCTTTTATGCCTGTTCTGAGGGA	CCTGGGTGATGTTGTTGGAG
cep152 L	AAATTGCCGAAAGGACAGCC	ACTTGATGAACTGAAGAATGGAGAA
cep152 S	AAAAAGTTCCAGCTCAAAAGCC	CTGGTCTTGTGTAGTTTCAGTCA
cetn1 L	GAAGAACAGAAACAAGAAATCCGAG	CTCATGGCAACCTTTAGCTCTT
cetn1 S	ATGACACAGAAAATGGCTGAAAAG	CCACCCGTTTCAGGTTCTTG
col3a1	CGGTGCTCAGTTAGGAGCAT	ACGACAATTACGTGCTGGGT
col4a3bp	TGACCACGACAAAGCTCCTC	CGCTACCGCCCTAAGTACAG
col4abp	TGACCACGACAAAGCTCCTC	CGCTACCGCCCTAAGTACAG
col6a1	GCCACGGACAGACTCAAGAA	AGCAAGAGCTTCACCAGTCC
cp110 L	AGTGTCCAAGAAAGGGTGGA	AGAGAAGTGGCCGAAACTGA
cp110 S	CATGGTGTTGCCGTGCTTT	GGACGATTTCTTGTAGTTGTGCTT
dll1	TACTGCCGTCCCAGAGATGA	TTTTGCATGGCTTGTGGTGG
dp1 (tfdp1) L	TCCATCATCAGTCAGTTCCGT	AGATTGCCTCTGTGGTGTCC
dp1 (tfdp1) S	CTGTCCATCCATCATCAATCAGT	TTGTCTTTGTGGGGTTCCAAG
e2f4 L	TACTAGCCAAGCTCCTGCTATAC	GGAGGCTGAAGACTGAAGGG
e2f4 S	TATTGCTACTAGTCCAGCCCCTA	TGAAGACTGAAGGGGACATGTAT
e2f5 L	TAGAGAAGAAGTCAAAGAACAGCAT	CTCAATTTCTGCTTTCAGGTGC
e2f5 S	GCTCTCTCAGTGCAAAACAACA	TAAGAGCTGGACGTGTTCTCC
ezr L	GATGAAAGCGCAGGCCAA	TTTCTCTCTCAATAGCTTCCCGT
fos	ATATGGGTCCACGTCCGTTT	GCTCCATTTTTCCTCTTCTTCCC
foxa1a	AGGACATGAGACGACAGATTGG	CAAGCCTGAGTTGCCGTAAGA
foxi1e	ACAATGCCTAGTCCTCAGCG	GGAGGTGTGATGGAAGGTCC
gmnc L	GCCAGGAACACATTCAAGCAA	GCAGTCATAACCCTGACCCC
gmnc S	CCTGAACTCTGCCTTTGTGAA	CCTGCTGTTTGGGTTGGTG
itln2	CTGCCCAAAAGACAACGGAC	TCAGGAAAATAGCCCCCACC
jun	CCAGCACGACGCTACTCC	ATTCTTGGGGCAGAGGAACTG
krt16	TAGTTTCGGTGGCAGTGACC	AGTTGGTGGTTGGCTGTCTC
krt19	GATTCTTGATGCCACCGTTGA	AATTTGTCCACCGACTTGGC

krt5.7	CTCGGAAGAGAAGGGGGCAA	CCATAACCAGCACCACCGAA
mcidas	CCCTGAAGGAGAAGAACATCCA	GCCCCGGAATTTTGTTTTGAC
myb S	TTAAGTCCTACACAAGCCCTCT	AATCTTTTGATCTTCCATCCTGCT
notch1	CCAGCAAAAAGAAACGGCGA	CAGTCGGCCTCAATCTCTCC
rcsd1 S (CapZIP)	AGTCTCGTTCCAGCGAATCA	GAGGTCGGCGCTTTATGGA
rhoA L	GTGCCCATTATTTTAGTTGGAAACA	CATGTCACGACCTTCTTCGG
rhoA S	AACCTGCCTTCTGATTGTGTTC	ATCCCAAAGGGCCAATTCCA
rRAS S	TTCATCCAGTCCTATTTTGTTTCGG	CTCTTCTTGTCCGGCTGTGT
tp73L	GCATCCAATCGAGCTGACG	TGCTGCCGATACTCTGATCC
tp73S	AACTTTGAGGTGACATTCCAGC	ATAACTTGATTTGGATGGGGCAC
tuba1a	GGGCCAGGTTAGACCACAAG	CGTCCTCTCCAGCTTCAACA
člověk		
actb	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
cc10	CACCCTGGTCACACTGGCTC	GGAGGGTGTCCACCAGCTTC
fos	CAGAGCCCCTCACCCTTTC	AGTTGGTCTGTCTCCGCTTG
foxJ1	ATCACGGACAACTTCTGCTA	AGGCACTTTGATGAAGCACT
mcidas	CAGCCCTCACCACCATAGAC	GGTGGGAATGGTTCTGCGA
myb	ACCACACATGCAGCTACCC	AGGCGCTTTCTTCAGGTAGG
tuba4a	CCGACTCAACGTGAGAC	CGTGGACTGAGATGCATT

Tab. 2 Sekvence použitých primerů

4.4 Lokalizace RNA pomocí *in situ* hybridizace

4.4.1 Transformace bakterií

Pro transformaci byly použity NEB 5-alpha *E.coli* kompetentní bakterie (Biolabs, C2987I). Bakterie se nechaly roztát na ledu po dobu 10 min. Poté k nim bylo přidáno 5 µl plazmidové DNA (80-100 ng). Směs byla jemně propipetována a umístěna na led na 30 min. Transformace byla provedena tepelným šokem: přesně 42 °C po dobu 30 s a směs byla inkubována na ledu na 5 min. K směsi bylo přidáno 950 µl komerčního SOC média (součást kitu) o pokojové teplotě a bakterie byly přesunuty do inkubátoru s třepačkou (37 °C, 60 min., 250 rpm). Poté bylo 100 µl naneseno a rozetřeno na předehřátou kultivační misku s přídavkem selekčních antibiotik (ampicilin) a misky byly inkubovány v 37 °C přes noc (víčkem dolů z důvodu kondenzace par).

Narostlé kolonie byly přeočkovány do 3 ml LB média s přídavkem antibiotik (ampicilin, 50ng/ml) v 15 ml zkumavce a inkubovány přes noc (37 °C, 250 rpm). Z 1 ml směsi byla vyizolována plazmidová DNA (viz. 4.4.2) a byla provedena

kontrolní restrikce (viz. 4.4.3 linearizace plazmidu), zbytek směsi byl po nezbytnou dobu uskladněn ve 4 °C. Plazmidová DNA vybraných klonů byla zaslána k sekvenaci (www.seqme.eu) z důvodu kontroly klonů. Klony obsahující plazmidy s genem zájmu byly následně namnoženy ve velkém objemu s 3 % bakteriální kultury a alikvot bakteriální kultury byl uschován v -80 °C (300 µl 50% sterilního glycerolu + 700 µl bakteriální kultury).

4.4.2 Kultivace bakterií a izolace plazmidové DNA

E.coli kompetentní bakterie obsahující plazmid s genem zájmu byly přes noc inkubovány v 50 ml LB média s přídavkem antibiotik (ampicilin, 50ng/ml) (37 °C, 250 rpm). Z bakterií byla izolovaná plazmidová DNA použitím komerčního QIAGEN® plasmid midi kit (QIAGEN, 12145) dle pokynů výrobce**.**

Protokol:

Po inkubaci byla bakteriální kultura centrifugována (6 000 x g 15 min 2-4 °C). Bakteriální pelet byl resuspendován ve 4 ml pufru P1 s přidaným roztokem RNasyA a LyseBlue a poté vortexován. Ke směsi byly přidány 4 ml pufru P2, vše bylo jemně promícháno (roztok zmodrá) a následně inkubováno v pokojové teplotě po dobu 5 min. Poté byly přidány 4 ml vychlazeného pufru P3, vše bylo jemně promícháno (roztok zbělá), inkubováno na ledu 15 min a centrifugováno (20 000 x g 30 min 2-4 °C). Supernatant byl přenesen do nového plastiku a opětovně centrifugován (20 000 x g 15 min 2-4 °C). Během centrifugace byly připraveny kolonky nanesením 4 ml pufru QBT (nechat projít roztok gravitací). Na kolonky byl nanesen supernatant, který se nechal samovolně protéct. Poté byly kolonky promyty 2x 10 ml pufrem QC. Plazmidová DNA byla eluována do nové zkumavky přidáním 5 ml pufru QF a precipitována přidáním 3.5 ml isopropanolu. Poté následovala centrifugace (15 000 x g 30 min 2-4 °C), supernatant byl odstraněn a DNA pelet byl promyt 2 ml 70% EtOH a centrifugován (15 000 x g 10 min 2-4 °C). Zbylý EtOH se nechal odpařit a plazmidová DNA byla rozpuštěna v NFW. Koncentrace byla měřena spektrofotometricky na přístroji Nanodrop 2000 a uskladněna v -20 °C.

4.4.3 Příprava sondy pro *in situ* hybridizaci (whole mount)

Linearizace plazmidu: 1 µg plazmidu, 1 µl restrikčního enzymu, 2 µl pufru, 2 µl BSA (pokud je vyžadováno), NFW doplněna do celkového objemu 10 µl. Restrikce probíhala přes noc v 37 °C a následně byla linearizace zkontrolována

pomocí gelové elektroforézy (1 µl linerizované směsi nanesen na 1% agarózový gel s přídavkem EtBr). Koncentrace zbylé linearizované směsi byla měřena spektrofotometricky na přístroji Nanodrop 2000.

Přepis do RNA sondy: 1 µg linearizovaného templátu, 4 µl transkripčního pufru, 2 µl DIG RNA značícího mixu (Roche, 11277073910), 2 µl polymerázy, NFW doplněna do celkového objemu 20 µl. Reakce běžela 3 hodiny ve 37 °C ve vodní lázni.

Přečištění sondy pomocí precipitace v roztoku LiCl (vzorek:LiCl, 1:1) (viz. 4.3.2.1). 1 µl sondy byl zkontrolován pomocí gelové elektroforézy a zbytek byl uskladněna v -80 °C. Seznam použitých sond viz. Tab. 3

	RNA	
gen zájmu	antisense	sense
otog (MXL1736-202711428, Dharmacon)	Kpn/T7	XhoI/SP6
eNOS	EcoRI/T3	XhoI/T7
nNOS	NotI/T3	ClaI/T7
alpha tubulin (MXL1736-202771973, Dharmacon)	Kpn/T7	XhoI/SP6
foxi1e (MXL1736-202771935, Dharmacon)	XmaI/T7	XhoI/SP6
foxa1 (MXL1736-202771841, Dharmacon)	Kpn/T7	XhoI/SP6
jun (893, EXRC)	SalI/T7	NotI/SP6

Tab. 3 Seznam použitých sond, restrikčních enzymů a polymeráz

T7 RNA polymeráza (Agilent, 600123-51), T3 RNA polymeráza (Agilent, 600111-51), SP6 RNA polymeráza (Agilent, 600151-51), Kpn (Biolabs, R0142S), XhoI (Biolabs, R0146S), EcoRI (Biolabs, R0101S), NotI (Biolabs, R0189L), XmaI (Biolabs, R0180L), SalI (Biolabs, R0138S), ClaI (Biolabs, R0197L)

Plazmidy (pBlueScript KS+) se zaklonovanou celou sekvencí *eNOS* a *nNOS* byly připraveny v minulosti Mgr. Radkem Šindelkou, Ph.D.

eNOS
forward: ATGGGGAGCTCGGCCAGT
reverse: TTTCTCTCTCTTCTCCTGTAGG

nNOS
forward: ATGGAAGAATATGAGTTCAGCGTT
reverse: TTATGAGCAGAAAACCTCATCTGA

4.4.4 *In situ* hybridizace (whole mount)

Odblaněná embrya byla fixovaná pomocí 4% PFA, 3x promyta v pufru PBT po dobu 15 min a pomocí 100% MeOH dehydratována. Takto připravená embrya byla uskladněna v -20 °C po dobu maximálně 6 měsíců.

Roztoky a chemikálie nezbytné pro *in situ* hybridizaci:

MeOH (25%, 50%. 75%, 100%), PBT (PBS + 0.1% Tween 20), 0.1 M triethanolamine (TEA), acetanhydrid, bělící roztok (1% H_2O_2, 5% formamide, 0.5 x SSC), 2xSSC, 0.2xSSC, Denhardův roztok (2% BSA, 2% polyvinyl pyrrolidone, 2% ficoll = 100x Denhardův roztok), hybridizační pufr (50% formamide, 5x SSC, 1mg/ml Torula RNA, 100µg/ml heparin, 1x Denhardův roztok, 0.1% Tween 20, 0.1% CHAPS, 10mM EDTA), MAB (100 mM kyselina maleinová, 150 mM NaCl, pH=7.8 – 7.5), blokovací médium (10% **B**oehringer**M**annheim**B**locking reagent : telecí sérum : MAB, 1:1:8), AP pufr (100 ml Tris, 50 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 0.1% Tween, 2mM levamisol), anti-DIG-AP, NBT, BCIP

Protokol:

1. den

Embrya byla rehydratována MeOH řadou (100%, 75%, 50%, 25%) – každý krok 10 min a promyta v roztoku PBT 3x10 min. Následně byla embrya opláchnuta 0.1 M TEA (2x 5 min) a inkubována 2x 5 min v čerstvě připraveném roztoku TEA + acetanhydrid (4 ml TEA + 12.5 µl acetanhydrid). Poté byla embrya promyta (3x 15 min) v PBT a bělena v průhledné destičce bělícím roztokem dokud nebyla bílá (1-3 hodiny). Po dobělení byla embrya promyta v roztoku 2xSSC po dobu 15 min, v PBT 2x 15 min a přesunuta do 1.5 ml zkumavek s 1 ml hybridizačního pufru. Embrya byla inkubována v 60 °C přes noc v hybridizační peci, do které bylo také přidáno potřebného množství hybridizačního pufru na následující den.

2. den

K předehřátému hybridizačnímu pufru byla přidána sonda (1 µg sondy/ 500 µl hybridizačního pufru) a embrya byla se sondou inkubována přes noc v 60 °C v hybridizační peci. Do pece bylo přidáno potřebného množství 2xSSC a 0.2xSSC na následující den.

3. den

Od embryí byl odebrán roztok se sondou (možnost uschování pro kontrolu degradace RNA, pokud by nastaly problémy při barvení) a embrya byla promyta předehřátým 2xSSC 4x 30 min v 60 °C, předehřátým 0.2xSSC 4x 30 min v 60 °C, nepředehřátým 0.2xSSC 1x 15 min při pokojové teplotě a MAB roztokem 3x 15 min při pokojové teplotě. Následně byla embrya inkubována v blokovacím médiu 2-3 hodiny a poté v 1 ml roztoku s protilátkou (0.63 µl anti-DIG-AP/1 ml blokovacího média) přes noc na třepačce ve 4 °C.

4. den

Embrya byla v pokojové teplotě promyta roztokem MAB 6x 30 min, AP pufrem 2x 30 min a inkubována ve tmě v 12 jamkové destičce v předchystaném barvícím roztoku (10 ml AP pufru, 36 µl NBT, 28 µl BCIP) dokud se embrya neobarví. Poté byla embrya promyta AP pufrem 3x 10 min a pro snížení pozadí inkubována ve 100% MeOH 2x 5 min. Následovala rychlá rehydratace (2 min 75%, 50%, 25% MeOH, PBS) a fixování embryí v 4% PFA. Embrya byla nafocena na makroskopu (Nikon SMZ 1500) a analyzována pomocí NIS-elements (D4.20.01), ImageJ (NIH, verze 1.42q) a Photoshop (Adobe, verze 11.0).

4.5 Lidské primární bronchiální epiteliální buňky (PBEC)

Pomocí lobektomie byla zdravým dárcům po jejich informovaném souhlasu odebrána bronchiální tkáň, která byla použita pro kultivaci již v minulosti dobře charakterizovaných PBEC. Kultivace PBEC byla provedena na Karolinska Institutet, Ústav environmentální medicíny, v rámci oddělení plicní toxikologie. Veškeré experimenty byly schváleny etickou komisí Karolinska Institutet ve Stockholmu.

4.5.1 Kultivace PBEC

100 000 buněk bylo vyseto na inserty (velikost pórů 0.4 µm, BD Falcon™, 353494) ve 12 jamkovém platíčku. Buňky byly kultivovány v PneumaCult™ Ex médiu (Stemcell Technologies, 05009) s přídavkem hydrokortizonu (48 µg hydrokortizonu/500 ml média, Stemcell Technologies, 07904) a antibiotik (1 ml ATB/500 ml média, penicilin a streptomycin, Gibco™, 15140122). Kultivační médium (1 ml) bylo přidáno k buňkám apikálně i bazálně. Buňky byly inkubovány v prostředí s 5% CO_2 při 37 °C a každý druhý den jim bylo vyměněno médium.

Při 90 – 95% konfluenci buněk bylo odebráno veškeré PneumaCult™ Ex médium a pouze do bazální komory byl přidán 1 ml PneumaCult™ ALI média s přídavkem hydrokortizonu (48 µg hydrokortizonu/100 ml média), antibiotik (200 µl ATB/100 ml média) a heparinu (200 µl heparinu/100 ml média, Stemcell Technologies, 07980). Buňky byly inkubovány v prostředí s 5% CO_2 při 37 °C a každý druhý den jim bylo vyměněno médium. Po 3 týdenní kultivaci byly buňky diferencované.

4.5.2 Inhibice oxidu dusnatého (NO)

Pro zablokování produkce NO byl použit chemický inhibitor NO syntáz TRIM. Konfluentním buňkám bylo odebráno veškeré PneumaCult™ Ex médium a pouze do bazální komory byl přidán 1 ml kompletního PneumaCult™ ALI média s 1 mM TRIM. Kontrolním vzorkům bylo do média přidáno ekvivalentní množství DMSO. Pro konstantní inhibici syntáz NO bylo médium s TRIMem měněno každý den a buňky byly inkubovány v prostředí s 5% CO_2 při 37 °C.

4.5.3 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Suspenze buněk byla barvena roztokem Trypan Blue 1:1 (Gibco™, 15250061). Do Bürkerovy komůrky bylo naneseno 10 µl suspenze. Živé buňky byly počítány v 16 čtvercích a do počítání byly zahrnuty vždy pouze 2 strany čtverce. Barvením Trypan Blue byla zároveň ověřena viabilita buněk.

4.5.4 Měření množství proteinu CC10

Množství proteinu CC10 bylo stanoveno metodou ELISA z média, ve kterém byly kultivovány PBEC. Pro měření byl využit komerční kit DuoSet ELISA pro lidský CC10 (R&D SYSTEMS®, DY4218) a každý vzorek byl měřen v technickém duplikátu.

Roztoky a chemikálie nezbytné pro metodu ELISA, které nebyly součástí kitu: promývací pufr (0.05% Tween 20 v PBS, pH = 7.2-7.4), ředící roztok (1% BSA v PBS, pH = 7.2-.7.4), substrát (1:1, R&D SYSTEMS®, DY999), zastavovací roztok (R&D SYSTEMS®, DY994)

Protokol:

Do destičky bylo naneseno 100 µl zachycovací protilátky/jamku a destička byla inkubována přes noc při pokojové teplotě. Další den byla odebrána zachycovací

protilátka, destička byla promyta promývacím pufrem (3x 400 µl) a do jamek bylo naneseno 300 µl ředícího roztoku, se kterým se destička inkubovala minimálně 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byla destička opět promyta promývacím pufrem (3x 400 µl) a do jamek bylo naneseno 100 µl vzorku (ředěný 30x) a standardu v ředícím roztoku (inkubace 2 hodiny při pokojové teplotě). Opětovně byla destička promyta promývacím pufrem (3x 400 µl) a do jamek bylo naneseno 100 µl detekční protilátky ředěné v ředícím roztoku (inkubace 2 hodiny při pokojové teplotě). Destička byla promyta promývacím pufrem (3x 400 µl), do jamek bylo naneseno 100 µl Streptavidinu-HRP (inkubace ve tmě 20 min při pokojové teplotě) a destička byla opětovně promyta promývacím pufrem (3x 400 µl). Do jamek bylo naneseno 100 µl substrátu (inkubace ve tmě 20 min při pokojové teplotě) a poté bylo k substrátu přidáno 50 µl zastavovacího roztoku, směs byla jemně promíchána a koncentrace proteinu byla určena spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm na přístroji Thermomax 250 reader (Molecular Devices, USA).

4.6 Seznam běžných chemikálií použitých v této práci

Chemikálie	**Firma**	**Katagolové číslo**
20x SSC pufr	Sigma-aldrich	S6639
Agaróza	Carl Roth	3810.3
Anhydrid kyseliny octové ($(CH_3CO)_2O$)	Penta s.r.o.	607-008-00-9
Anti-digoxigenin-AP, Fab gragment	Roche	11093274910
BCIP 5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphate ($C_8H_6BrClNO_4P \cdot C_7H_9N$)	Roche	11383221001
Boehringer Mannheim Blocking reagent	Roche	11096176001
BSA	Thermo Scientific™	B14
EDTA ($[-CH_2N(CH_2CO_2Na)CH_2CO_2H]_2$)	Sigma-aldrich	E7889
Ethanol (C_2H_6O)	Penta s.r.o.	603-002-00-5
Ethidium bromide ($C_{21}H_{20}BrN_3$)	Invitrogen™	15585011
Ficoll	GE healthcare	PM400
Formamide ($HCONH_2$)	Sigma-aldrich	F9037
Gentamicin	Sigma-aldrich	G1378
Glycerol ($C_3H_8O_3$)	Sigma-aldrich	G5516
H_2O bez nukleáz	Invitrogen™	10977035
Heparin ($C_{12}H_{19}NO_{20}S_3$)	Calbiochem	375095
HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$)	Carl Roth	9105.4
Hydrogenuhličitan sodný ($NaHCO_3$)	Penta s.r.o.	144-55-8
Hydroxid sodný (NaOH)	Penta s.r.o.	011-002-006
CHAPS ($C_{32}H_{58}N_2O_7S \cdot xH_2O$)	Sigma-aldrich	C3023
Chlorid draselný (KCl)	Penta s.r.o.	7447-40-7
Chlorid hořečnatý ($MgCl_2$)	Penta s.r.o.	7791-18-6

Chlorid sodný ($NaCl$)	Penta s.r.o.	7647-14-5
Chlorid vápenatý ($CaCl_2$)	Penta s.r.o.	017-013-00-2
Chloroform ($CHCl_3$)	Penta s.r.o.	602-006-00-4
Isopropylalkohol (C_3H_8O)	Penta s.r.o.	603-117-00-0
Kozí sérum	Sigma-aldrich	G9023
Kyselina maleinová ($C_4H_4O_4$)	Carl Roth	3538.1
Kyselina octová (CH_3COOH)	Penta s.r.o.	64-19-7
LB agar	Sigma-aldrich	L2897
L-cystein hydrochloride monohydrát ($HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$)	Sigma-aldrich	C7880
Levamisol ($C_{11}H_{12}N_2S \cdot HCl$)	Sigma-aldrich	L9756
Methanol (CH_3OH)	Penta s.r.o.	603-001-00-x
NBT nitro blue tetrazolium ($C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$)	Roche	11383213001
Paraformaldehyd ($HO(CH_2O)nH$)	Sigma-aldrich	158127
PBS	Sigma-aldrich	P5368
Peroxid vodíku (H_2O_2)	Penta s.r.o.	008-003-00-9
Polyvinylpyrrolidon ($(C_6H_9NO)_n$)	Sigma-aldrich	PVP40
Síran hořečnatý ($MgSO_4$)	Sigma-aldrich	63139
TE pufr	Invitrogen™	12090015
Telecí sérum	Sigma-aldrich	N4762
Torula RNA	Sigma-aldrich	R6625
Triethanolamin hydrochlorid ($(HOCH_2CH_2)_3N \cdot HCl$)	Sigma-aldrich	T1502
Tris ($NH_2C(CH_2OH)_3$)	Sigma-aldrich	93362
Triton X	Carl Roth	3051.3
Tween 20	Sigma-aldrich	P1379
Xylen ($C_6H_4(CH_3)_2$)	Penta s.r.o.	1330-20-7
β-merkatoethanol ($HSCH_2CH_2OH$)	Sigma-aldrich	M6250

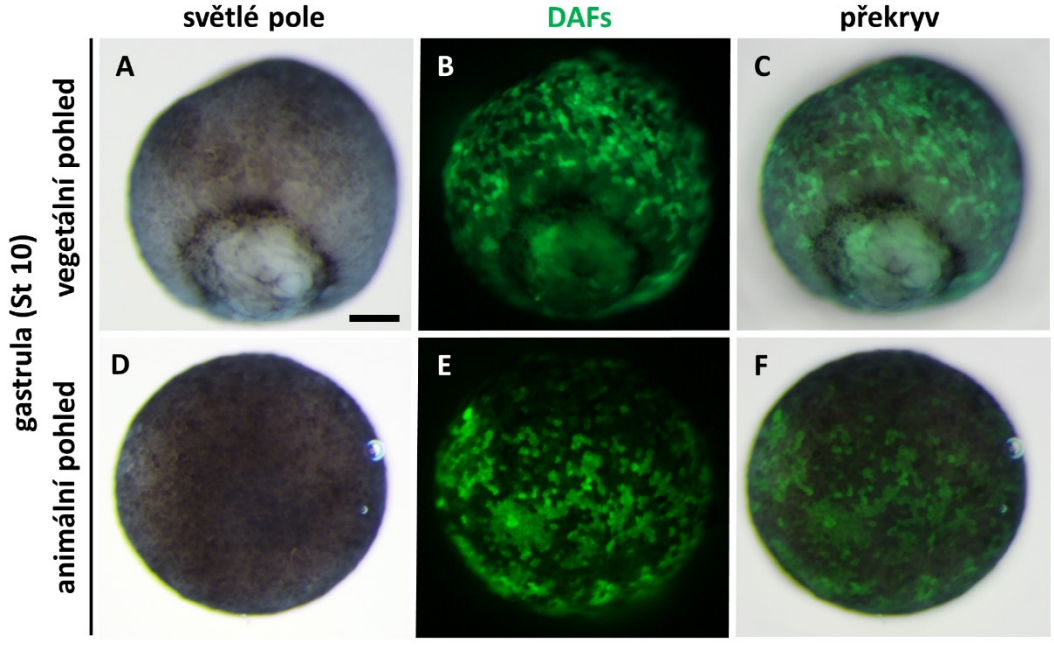
5 Výsledky

5.1 Produkce oxidu dusnatého (NO) v embryonálním vývoji drápatky vodní

5.1.1 Produkce NO v embryonální pokožce

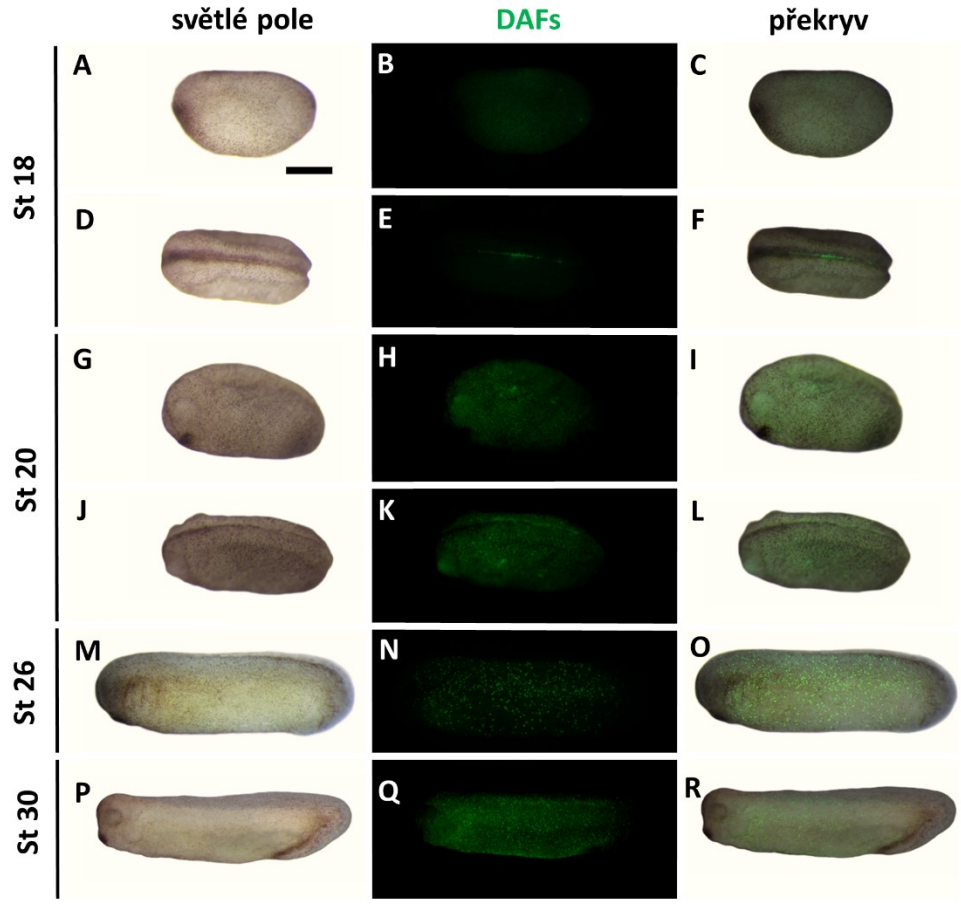
Pomocí indikátorů NO – DAF-FM a DAF-2DA (možná zkřížená reaktivita s NO2-/NO3- a ONOO-) byla již v minulosti identifikována produkce NO v pokožce drápatky vodní (Jacox *et al.*, 2014). U jiných modelových organismů, jako je například zebřička, byla produkce NO detekována v notochordu a pomocí tohoto indikátoru byla vizualizována také kostra zebřičky (Renn *et al.*, 2014).

Prvním cílem této práce byla detailní analýza produkce NO během embryonálního vývoje drápatky vodní kombinovaným působením indikátorů DAF-FM a DAF-2DA (1:1). Vizualizace NO byla provedena ve stádiích 10 (Obr. 8), 18, 20, 26, 30 (Obr. 9), 36 a 40 (Obr. 17).



Obr. 8 Produkce NO ve stádiu gastruly

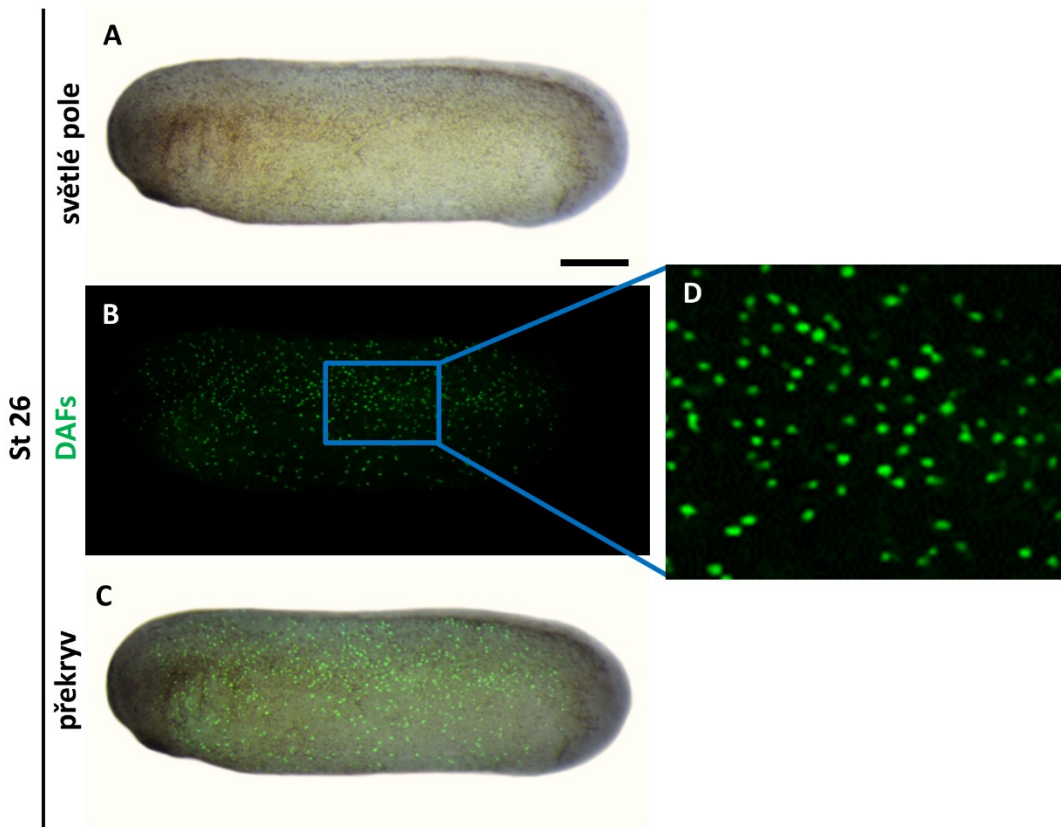
Embrya ve stádiu 10 s manuálně odstraněnou vitelinní membránou byla inkubována v roztoku s indikátorem NO (DAF-FM+DAF-2DA, 1:1). Nejméně 5 embryí bylo použito v rámci experimentu. Měřítko: 300 μm Zvětšení: 5x



Obr. 9 Mapa produkce NO během embryonálního vývoje

Embrya ve stádiu 18 (A-F), 20 (G-L), 26 (M-O) a 30 (P-R) s manuálně odstraněnou vitelinní membránou byla inkubována v roztoku s indikátorem NO (DAF-FM+DAF-2DA, 1:1). Nejméně 5 embryí bylo použito na podmínku. Měřítko: 300 µm Zvětšení: 3.2x

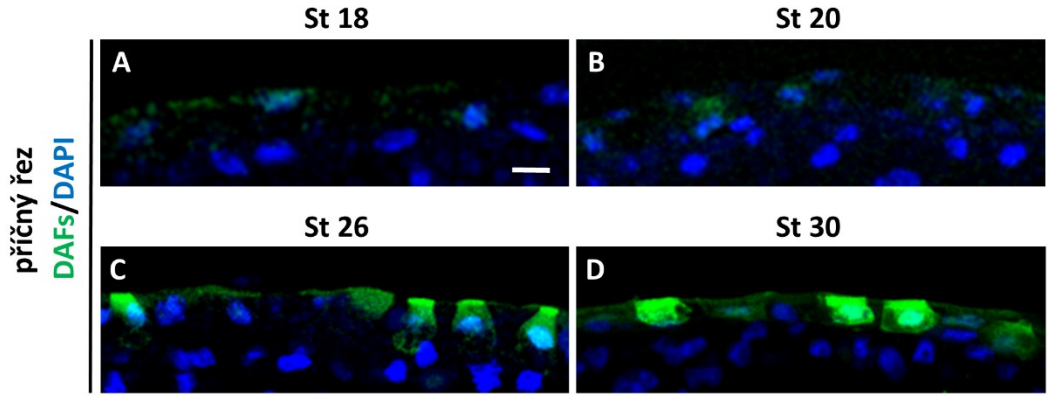
Již v časných stádiích embryonálního vývoje (gastrula) je možné detekovat produkci NO (Obr. 8). Během embryonálního vývoje se NO akumuluje pouze v určitých epidermálních buňkách (Obr. 9N,O,Q,R, 10). Buňky jsou pravidelně roztroušeny v pokožce, což ukazuje produkci NO pouze určitým buněčným typem a různá intenzita signálu naznačuje, že NO je produkován více než jedním epidermálním typem (Obr. 10D).



Obr. 10 Produkce NO ve stádiu 26

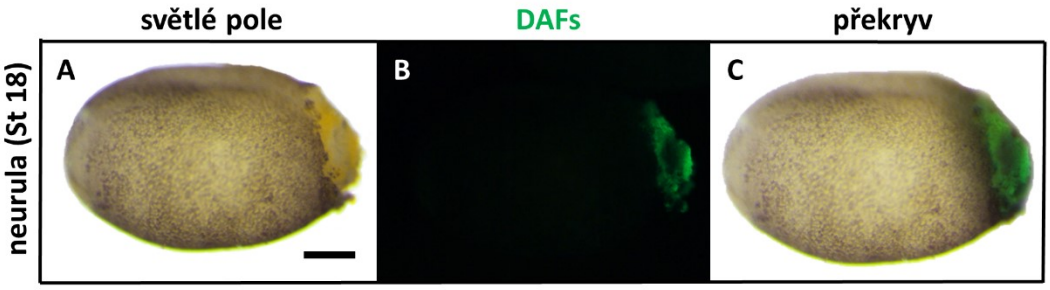
Embrya ve stádiu 26 byla barvena indikátorem NO (DAF-FM+DAF-2DA, 1:1) (A-C). Zvětšená epidermální oblast pro snažší rozpoznání pozitivního signálu (D). Nejméně 5 embryí bylo použito v rámci experimentu. Měřítko: 500 µm Zvětšení: 4x

Příčné řezy embryí ve stádiu 18, 20, 26 a 30 navíc ukazují produkci NO ve vnější epidermální vrstvě (Obr. 11). V pozdějších vývojových stádií (ve srovnání se stádii 18 a 20) je intenzita fluorescenčního signálu NO vizuálním porovnáním výraznější a je akumulována v apikální oblasti buňky (Obr. 11 C,D). K masivní produkci NO navíc dochází během celého embryonálního vývoje následkem mechanické poranění embrya (Obr. 12).



Obr. 11 Produkce NO v příčných řezech stádií 18, 20, 26 a 30

Embrya ve stádiu 18 (A), 20 (B), 26 (C) a 30 (D) byla barvena indikátorem NO (DAF-FM+ DAF-2DA, 1:1) a následně byla pomocí DAPI barvena jádra. Překryvem fluorescenčních signálů byla odhalena produkce NO ve vnější vrstvě embryonální pokožky. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Měřítko: 15 µm Zvětšení: 20x

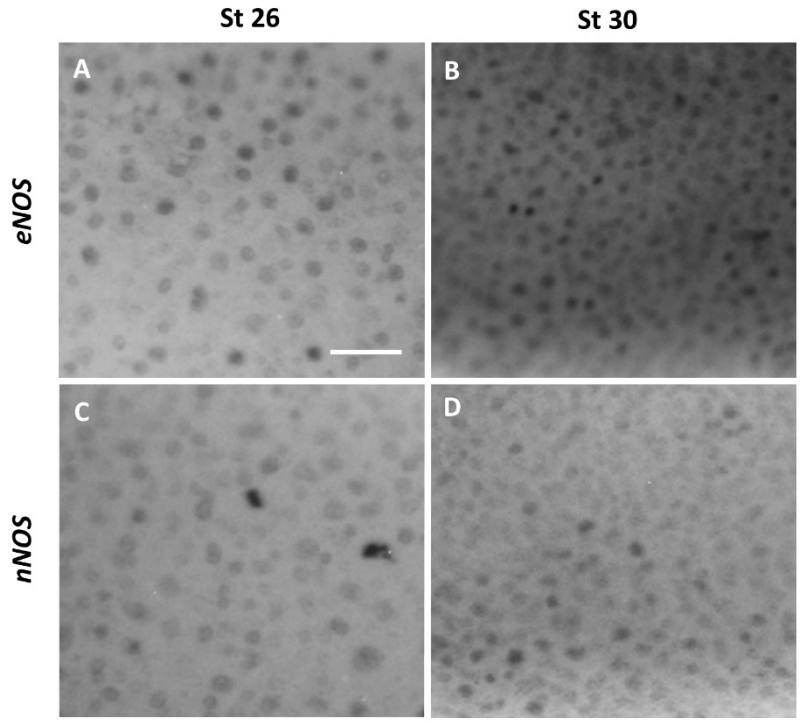


Obr. 12 Produkce extrémní hladiny NO v důsledku mechanického poškození

Poraněná embrya ve stádiu neuruly byla inkubována v roztoku s indikátorem NO (DAF-FM+ DAF-2DA, 1:1). Nejméně 5 embryí bylo použito v rámci experimentu. Měřítko: 500 µm Zvětšení: 5x

5.1.1.1 Potvrzení výskytu NO v embryonální pokožce

Pro potvrzení produkce NO v embryonální epidermis drápatky vodní byla zvolena detekce konstitutivních syntáz NO (eNOS, nNOS) metodou *in situ* hybridizace (Obr. 13). Výsledky analýzy se shodují s produkcí NO v pokožce drápatky vodní. Ve stádiu 26 (Obr. 13A,C) a 30 (Obr. 13B,D) jsou *eNOS* (Obr. 13A,B) a *nNOS* (Obr. 13C,D) s různou intenzitou roztroušeně exprimovány v embryonální pokožce.

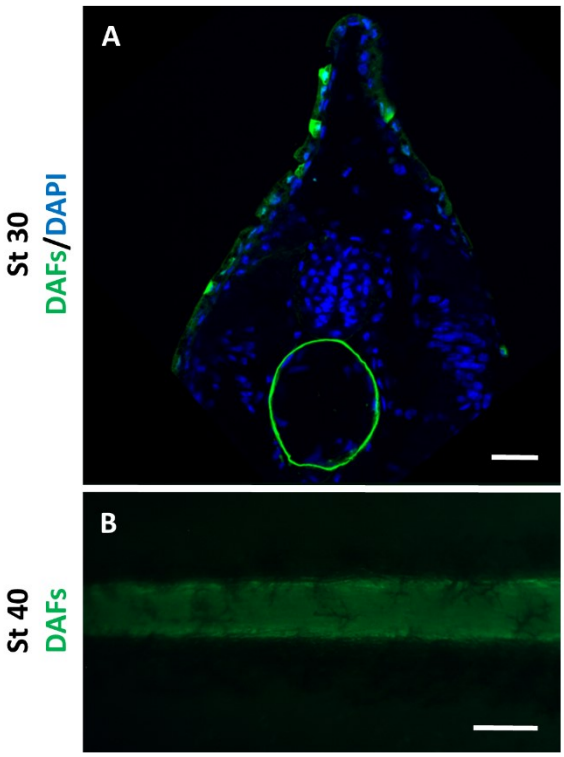


Obr. 13 Exprese NO syntáz v embryonální pokožce drápatky vodní

Embrya drápatky vodní byla ve stádiu 26 (A,C) a ve stádiu 30 (B,D) hybridizována se sondami proti *eNOS* (A, B) a *nNOS* (C, D). Pozitivní signál se s různou intenzitou nachází v jednotlivých epidermálních buňkách. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Měřítko: 75 μm Zvětšení: 11.25x

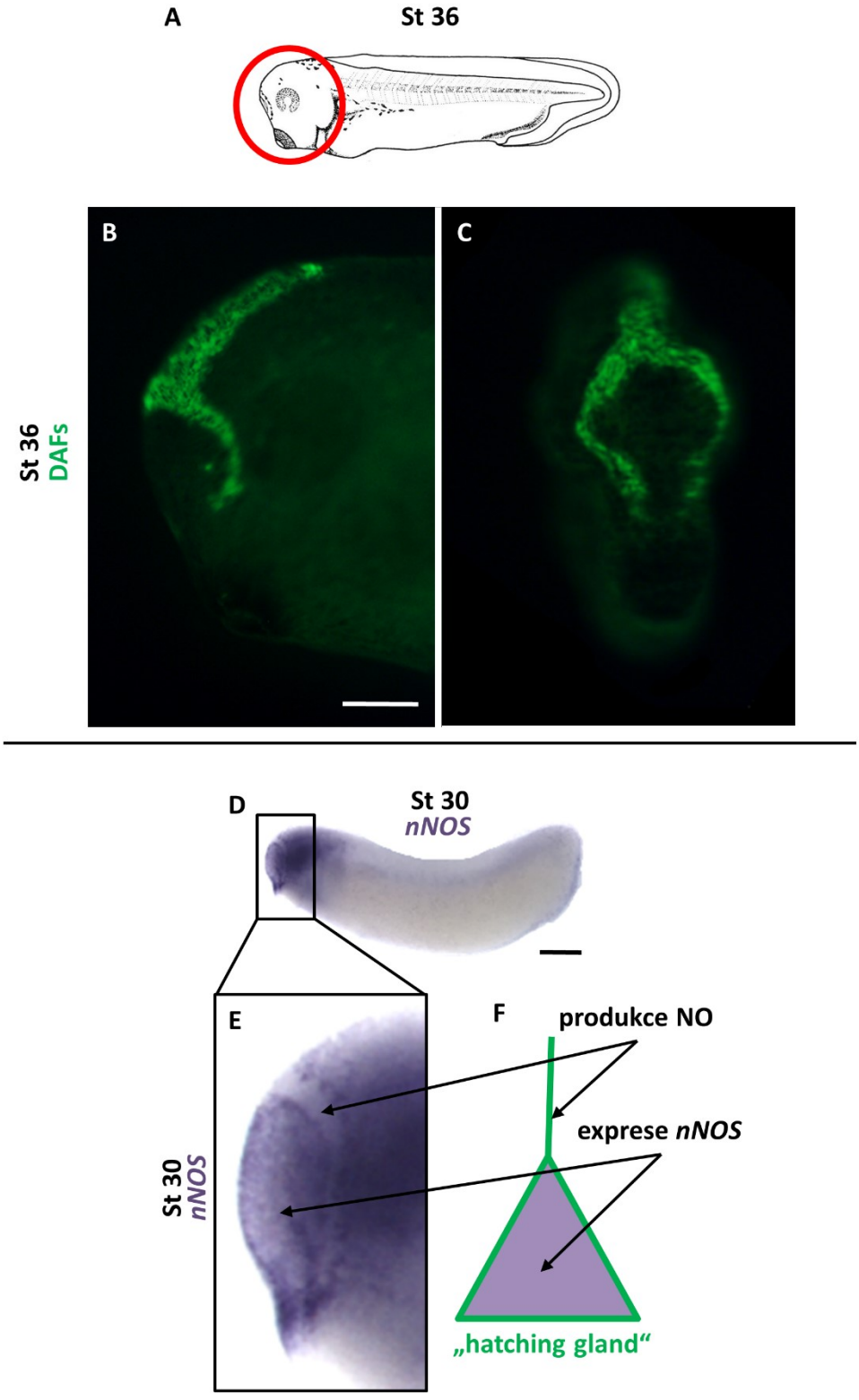
5.1.2 Produkce NO v dalších oblastech embrya

Kromě pokožky je NO také produkován v jiných oblastech embrya. Stejně jako je tomu u zebřičky, dochází u drápatky vodní k produkci NO v notochordu (Obr. 14) a již ve stádiu 18 je pozorovatelná produkce NO v neurální liště (Obr. 9E,F). Kromě epidermálních buněk a notochordu je NO během embryonálního vývoje drápatky vodní produkován v tzv. „hatching gland“ (Obr. 15B,C), která produkuje enzymy na rozrušení vitelinní membrány, čímž usnadňuje uvolnění embrya z embryonálních obalů (Carroll and Hedrick, 1974). Je zajímavé, že ve vnitřní oblasti, která je toutu žlázou ohraničena, se nenacházejí buňky charakteristické pro embryonální pokožku – jako jsou ionocyty nebo MCCs (Obr. 16) a navíc je v této oblasti exprimována *nNOS* (Obr. 15D,E,F). V současné chvíli nelze odhadnout úlohu NO v této žláze.



Obr. 14 Produkce NO v notochordu

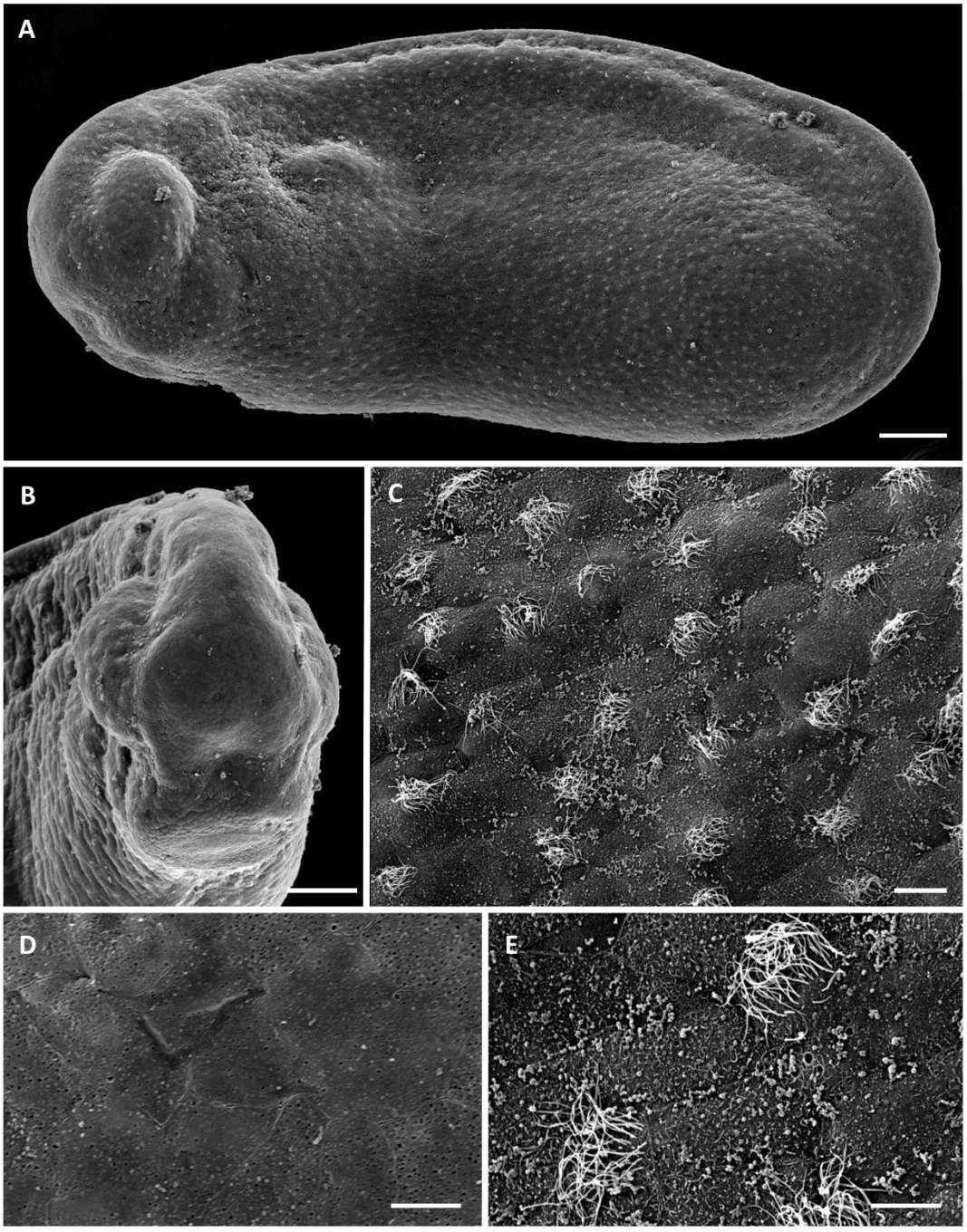
Embrya ve stádiu 30 (A) a 40 (B) byla barvena indikátorem NO (DAF-FM+DAF-2DA, 1:1) a následně byla pomocí DAPI barvena jádra (A). Překryvem fluorescenčních signálů byla odhalena produkce NO ve vnější vrstvě embryonální pokožky (A) a notochordu (A,B) . Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Měřítko: 50 µm (A), 100 µm (B) Zvětšení: 10x (A), 5x (B)



Obr. 15 Produkce NO v tzv. „hatching gland“

Schématické znázornění použitého vývojového stádia se zvýrazněním studované oblasti (A). Embrya byla ve stádiu 35 inkubována v roztoku s indikátorem NO (DAF-FM+DAF-2DA, 1:1) - laterální (B) a frontální (C) pohled na oblast hlavy s pozitivním fluorescenčním signálem v tzv. „hatching gland“. Celá embrya drápatky vodní ve stádiu 30 byla hybridizována se sondou proti n*NOS* (D). Zvětšená

oblast hlavy pro lepší identifikaci pozitivního *nNOS* signálu (E). Schématické znázornění „hatching gland“ zobrazující oblasti exprimující *nNO*S a oblasti produkující NO (F). Nejméně 5 embryí bylo použito v rámci experimentu. Měřítko: 400 µm Zvětšení: 8x (B,C), 3.2x (D)



Obr. 16 Povrch embrya ve stádiu 26

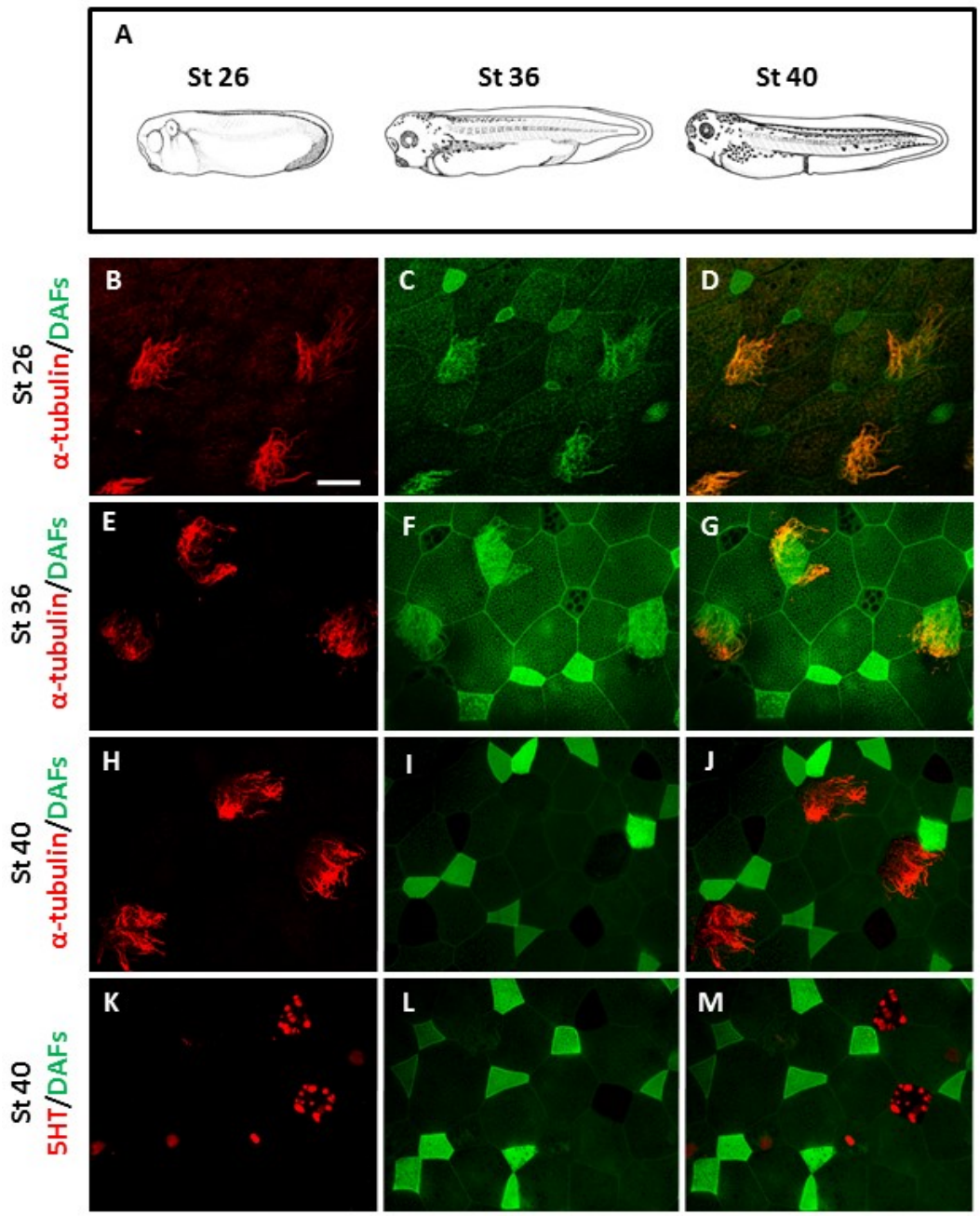
Povrch celých embryí ve stádiu 26 byl studován pomocí skenovací elektronové mikroskopie (A). Frontální pohled na embryo ve stádiu 26 (B). Povrch embrya mimo hlavovou oblast (C,E). Detail povrchu, který je ohraničen tzv. „hatching gland“ (D). Nejméně 3 embrya byla použita v rámci experimentu. Měřítko: 200 µm (A), 100 µm (B), 25 µm (C), 10 µm (D,E) Zvětšení: 55x (A), 140x (B), 500x (C), 2000x (D,E).

5.2 Určení epidermálního buněčného typu produkujícího NO

Z předchozích výsledků je zřejmá produkce NO ve vnější vrstvě epidermis (stádium 26 a 30), ovšem pouze v některých buňkách a s různou intenzitou. Pro určení přesného buněčného typu, ve kterém je NO produkován, byla zvolena metoda dvojího barvení. Nejprve byla embrya *in vivo* barvena kombinací DAF-FM a DAF-2DA (1:1) pro vizualizaci NO a následně se barvila protilátkami proti α-tubulinu (detekce MCCs) a proti 5HT (detekce SSCs) (Obr. 17).

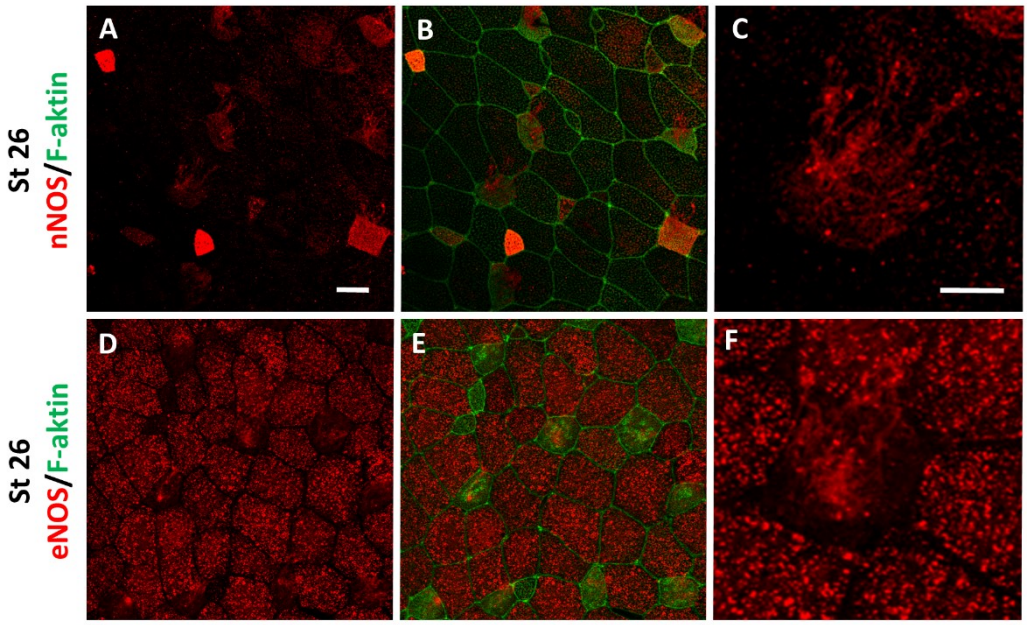
Ve stádiu 26 byla produkce NO detekována v MCCs (Obr. 17B-D). NO je v tomto stádiu kromě MCCs produkován dalším epidermálním typem, který byl identifikován na základě morfologie. Jedná se ionocyty (Obr. 17C,D) – malé buňky interkalující do vnější epidermální vrstvy před vývojem SSCs. Záměna s SSCs nemohla nastat právě díky tomu, že se SSCs ve stádiu 26 nenachází ve vnější epidermální vrstvě. Ve stádiu 36 je NO stále produkován MCCs a ionocyty (Obr. 17E-G). Vizuálním porovnáním intenzity v MCCs a ionocytech je patrná zvýšená intenzita signálu NO v ionocytech, které ve vyšších vývojových stádiích tvoří páry (Obr. 17F,G,I,J,L,M). U SSCs nebyla detekována produkce NO v žádném z vybraných vývojových stádiích (Obr. 17F,G,K-M).

Produkce NO v ionocytech a MCCs je navíc podpořena výskytem nNOS ve stejných buněčných typech (Obr. 18A-C). Protilátka proti eNOS vykazovala výrazné pozadí a pravděpodobně i nespecifickou vazbu, jelikož pozitivní signál se kromě MCCs nacházel v „goblet“ buňkách (Obr. 18D-F), zatímco výskyt na úrovni RNA byl detekován pouze v určitých buňkách roztroušených v embryonální epidermis.



Obr. 17 Identifikace epidermálního buněčného typu produkujícího NO

Schématické znázornění vybraných vývojových stádií (A). Embrya byla barvena kombinací indikátorů NO (DAF-FM+DAF-2DA, 1:1) ve stádiu 26, 36 a 40 (C, F, I, L) s protilátkou proti α-tubulinu ve stádiu 26, 36 a 40 (B,E,H) a protilátkou proti 5HT ve stádiu 40 (K). Pomocí překryvu fluorescenčních signálů byla odhalena produkce NO v MCCs (D,G) a ionocytech (D,G,J,M). Produkce NO nebyla detekována v SSCs (M). Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Měřítko: 20 µm Zvětšení: 40x



Obr. 18 Výskyt eNOS a nNOS v epidermis drápatky vodní

Embrya ve stádiu 26 byla inkubována s protilátkou proti nNOS (A-C) a protilátkou proti eNOS (D-F). Aktin byl vizualizován pomocí značeného phallodinu (A,E). Apikální povrch embryí byl vizualizován konfokální mikroskopií. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Měřítko: 20 µm Zvětšení: 40x

5.3 Vliv ztráty produkce NO na vývoj embryonální epidermis

5.3.1 Fenotypový projev embryí s inhibovanou produkcí NO

Pro studium úlohy NO během embryonálního vývoje pokožky byla provedena inhibice produkce NO ve stádiích 26, 30 a 36. Produkce NO byla inhibovaná od oplozeného vajíčka pomocí syntetických morpholino oligonukleotidů (MO) proti *eNOS*, *nNOS* a *iNOS*. Vysoké koncentrace *nNOS* MO a *eNOS* MO měly za následek zastavení embryonálního vývoje během gastrulace až neurulace, zatímco embrya injikována kontrolním MO a *iNOS* MO se vyvíjela normálně.

Použití nižších koncentrací MO vedlo ke zpomalení embryonálního vývoje. Embrya s inhibovanou *nNOS* jsou charakteristické redukovanou hlavovou oblastí a celkově kratším tělem (Obr. 19C), embrya s inhibovanou *eNOS* mají rovněž redukovanou hlavovou oblast (Obr. 19B) a okolo stádia 35 jsou rozpoznatelné mírně zakrouceným ocáskem. Embrya s inhibovanou produkcí NO pomocí *iNOS* MO nevykazovala fenotypové změny během vývoje ani v případě použití vysokých koncentrací a byla srovnatelná s kontrolními embryi (Obr. 19A).

Účinek MO byl testován pomocí RT-qPCR a bylo zjištěno téměř kompletní porušení správného sestřihu *eNOS*, *iNOS* a *nNOS* RNA.

Obr. 19 Fenotypový projev embryí s inhibovanou produkcí NO

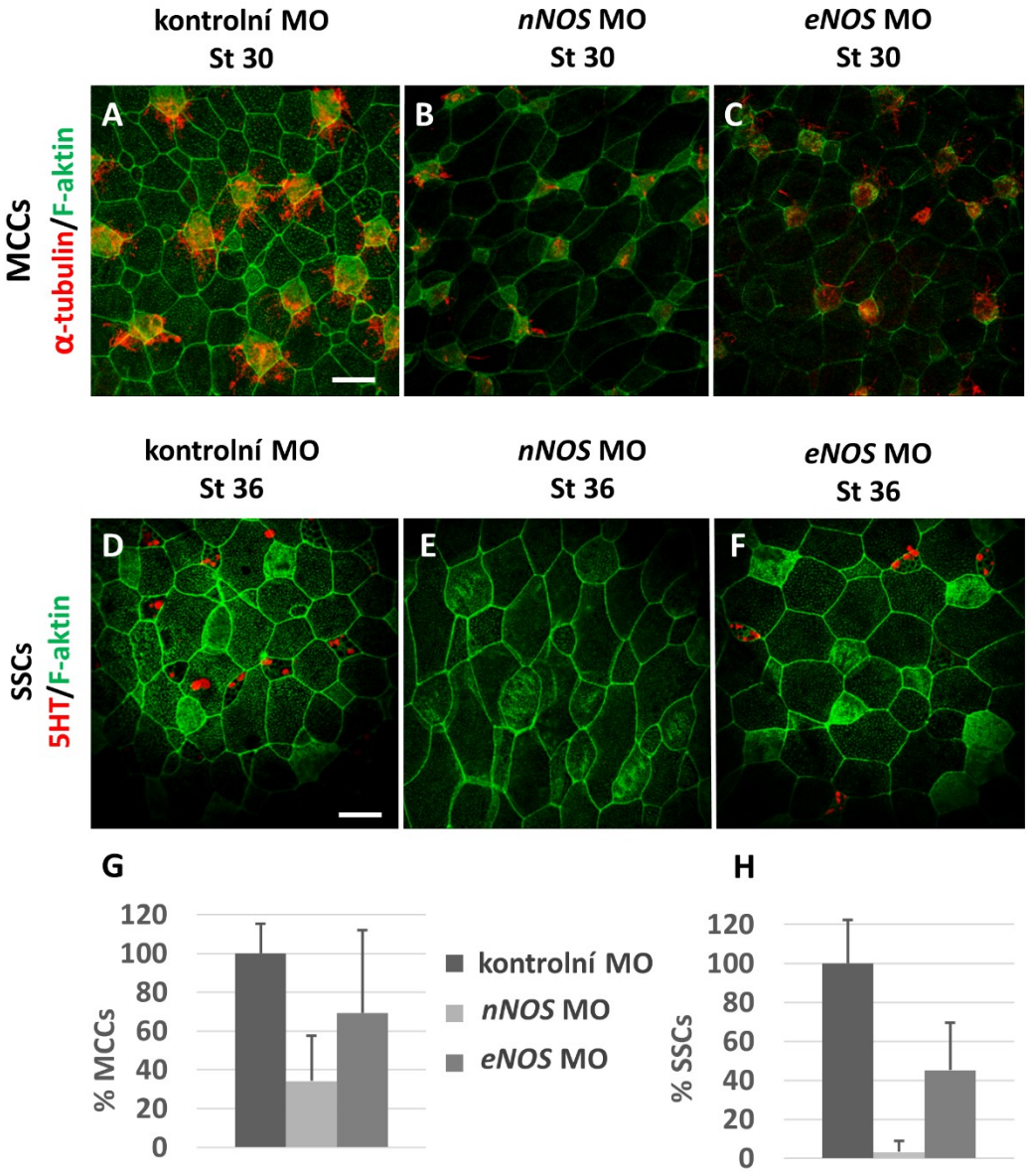
Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng kontrolního MO (A), 34 ng *eNOS* MO (B) a 17 ng *nNOS* MO (C). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 26. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Měřítko: 400 µm Zvětšení 4x

5.3.2 Vliv inhibice NO na embryonální pokožku

Úloha NO na vývoj embryonální pokožky byla studována metodou imunohistochemického barvení (Obr. 20). Vzorky byly barveny protilátkou proti α-tubulinu ve stádiu 30 pro detekci MCCs (Obr. 20A-C) a protilátkou proti 5HT (serotoninu) ve stádiu 36 pro vizualizaci SSCs (Obr. 20D-E). U embryí s inhibovanou produkcí NO byl pozorován statisticky významný pokles množství MCCs a SSCs (vztaženo na plochu). Inhibice NO produkce pomocí *nNOS* MO měla za následek pokles MCCs o 66 % (Obr. 20B,G) a SSCs o 97 % (Obr. 20E,G). Použití *eNOS* MO vedlo k poklesu množství MCCs o 31 % (Obr. 20C,G) a SSCs o 55 % (Obr. 20F,G). V případě MCCs byly započítány jako pozitivní buňky i buňky obsahující pouze jednu cilii (Obr. 20).

Z důvodu nedostupnosti funkčních specifických protilátek proti ionocytům a „goblet“ buňkám, byly tyto buněčné typy studovány pomocí „whole-mount“ *in situ* hybridizace. Pro porovnání a zároveň potvrzení předchozích imunohistochemických výsledků byly touto metodou rovněž analyzovány MCCs a SSCs (Obr. 21). Jednotlivé buněčné typy byly u embryí ve stádiu 26 vizualizovány pomocí specifických sond: *α-tubulin* pro MCCs (Obr. 21A-C), *foxa1a* pro prekurzory SSCs (Obr. 21D-F), *foxi1e* pro ionocyty (Obr. 21G-I) a *otogelin* pro „goblet“ buňky (Obr. 22). Inhibice NO pomocí *nNOS* MO ve srovnání s kontrolními vzorky vedla ke statisticky významnému poklesu množství MCCs o 50 % (Obr. 21J), prekurzorů SSCs o 85 % (Obr. 21K) a ionocytů o 37 % (Obr. 21L). Použití *eNOS* MO snížilo množství MCCs

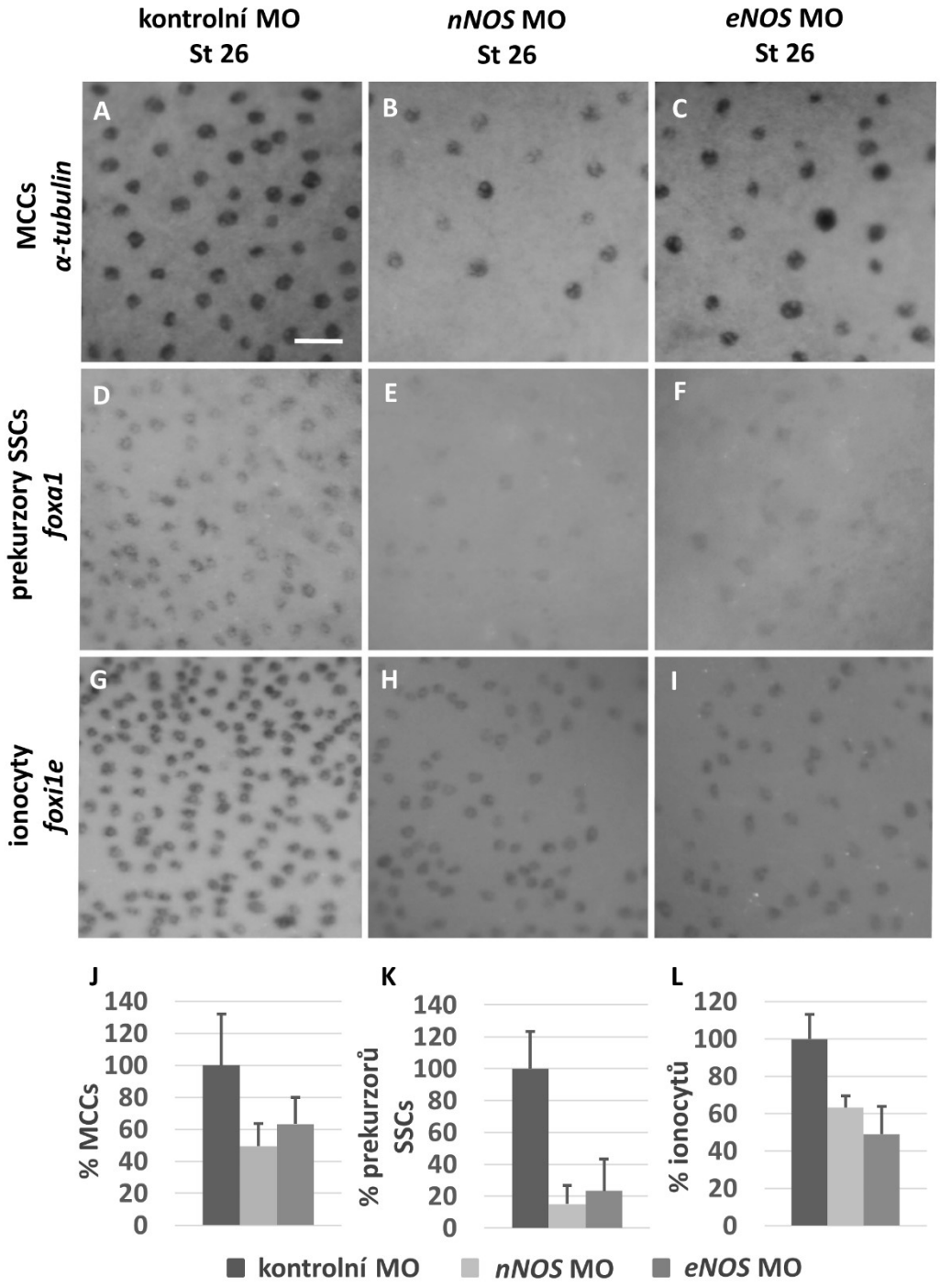
o 36 % (Obr. 21J), prekurzorů SSCs o 77 % (Obr. 21K) a ionocytů o 51 % (Obr. 21L). U „goblet“ buněk pravděpodobně nedochází k početním změnám v důsledku inhibice NO (Obr. 22).



Obr. 20 Vliv NO na MCCs a SSCs

Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng kontrolního MO (A,D), 17 ng *nNOS* MO (B,E) a 34 ng *eNOS* MO (C,F). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 30 (A-C) a stádiu 36 (D-F). MCCs byly barveny protilátkou proti α-tubulinu (A-C), SSCs byly barveny protilátkou proti 5HT (D-F) a aktin byl obarven pomocí značeného phallodinu (A-F). Apikální povrch embryí byl vizualizován konfokální mikroskopií (zvětšení: 40x, měřítko: 20 µm,). Inhibice produkce NO vedla ke snížení počtu MCCs a SSCs buněk v embryonální epidermis (G). Kvantifikace buněk byla provedena programem ImageJ a Graphpad. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována jednosměrnou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) s následným Tukeyho testem, která

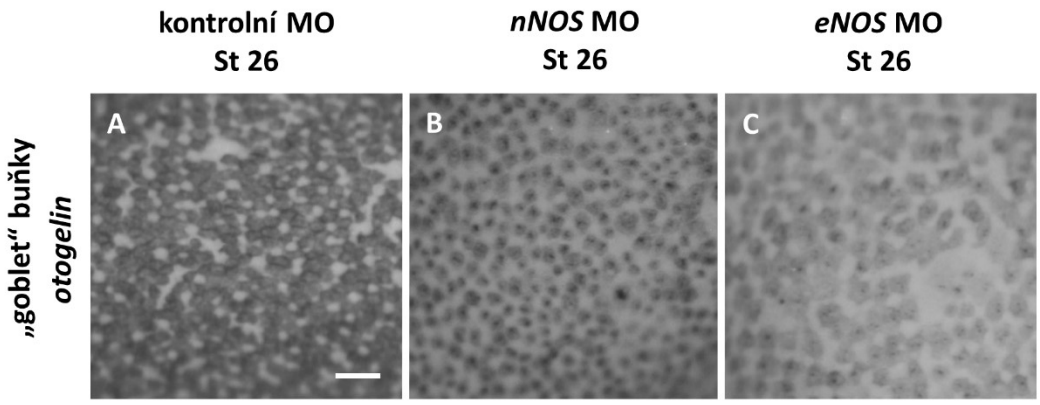
potvrdila statisticky významnou změnu ($P < 0.005$) ve všech případech, kromě kontrolní MO x *eNOS* MO pro MCCs ($P > 0.005$).



Obr. 21 Vliv NO na vývoj MCCs, prekurzorů SSCs a ionocytů

Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng kontrolního MO (A,D,G), 17 ng *nNOS* MO (B,E,H) a 34 ng *eNOS* MO (C,F,I). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 26 (A-I) a hybridizována se sondou proti *α-tubulinu* pro vizualici MCCs (A-C), sondou proti *foxa1a* pro vizualizaci prekurzorů SSCs (D-F) a sondou proti *foxi1e* pro detekci ionocytů (G-I). Povrch embryí byl nafocen makroskopem

(zvětšení: 11.25x, měřítko: 50 μm). Inhibice produkce NO vedla k poklesu množství MCCs (J), prekurzorů SSCs (K) a ionocytů (L) v embryonální epidermis. Kvantifikace buněk byla provedena programem ImageJ a Graphpad. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována jednosměrnou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) s následným Tukeyho testem, která potvrdila statisticky významnou změnu ($P < 0.005$) ve všech případech.



Obr. 22 Vliv NO na vývoj „goblet" buněk

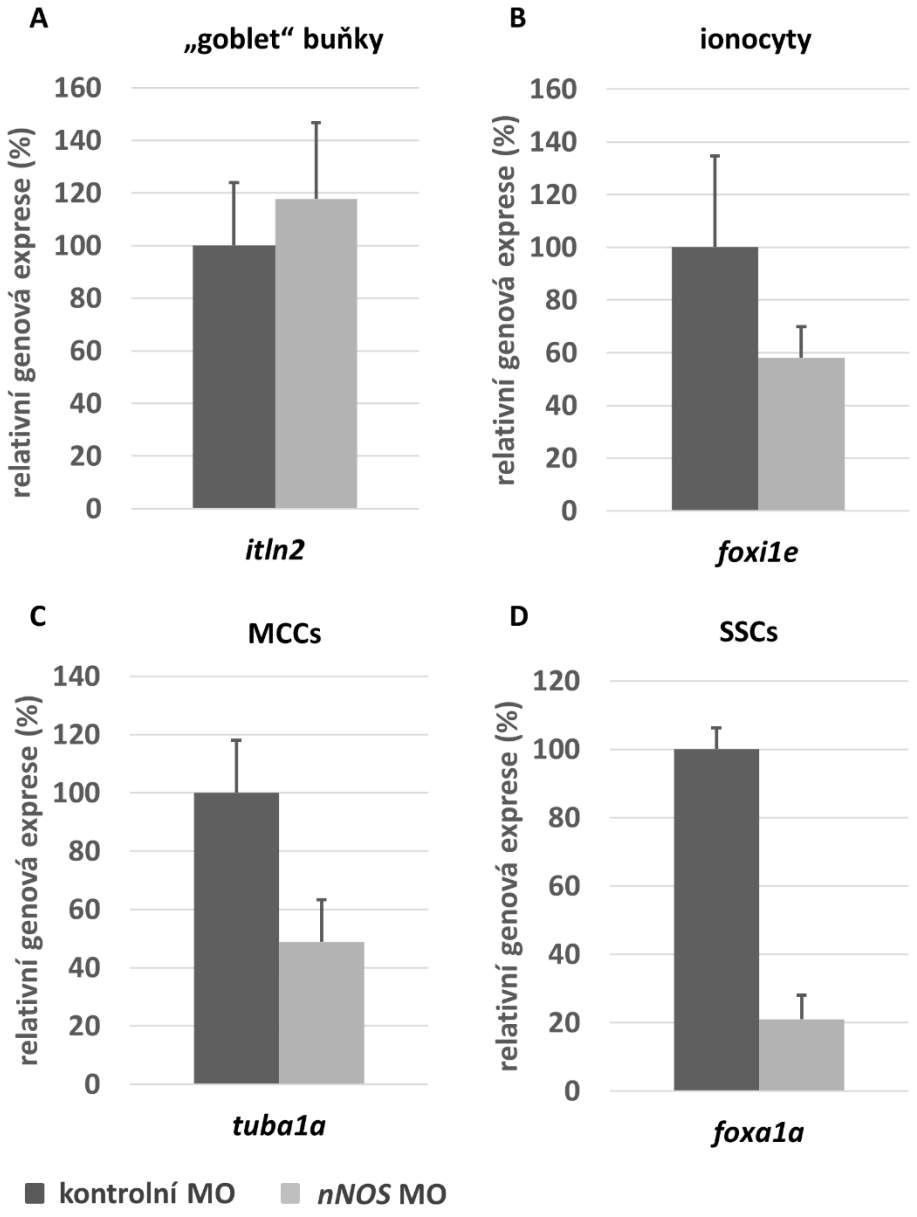
Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng kontrolního MO (A), 17 ng *nNOS* MO (B) a 34 ng *eNOS* MO (C). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 26 (A-C) a hybridizována se sondou proti *otogelinu* pro vizualici „goblet" buněk. Zpracování dat bylo provedeno v programu ImageJ. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Zvětšení: 11.25x, Měřítko: 50 μm

Redukce MCCs, ionocytů a SSCs v důsledku inhibovaného NO byla také potvrzena na úrovni genové exprese pomocí RT-qPCR (Obr. 23), jelikož epidermální typy je možné detekovat pomocí specifických markerových genů (*foxi1e* pro ionocyty, *α-tubulin* pro MCCs, *foxa1a* pro SSCs a *itln2* pro „goblet" buňky). Pro analýzu byla použita embryonální pokožka, která byla odebrána kontrolním a ovlivněným embryím ve stádiu 26. U embryí s inhibovanou produkcí NO, ve srovnání s kontrolními vzorky, došlo ke statisticky významnému poklesu relativní exprese markerových genů pro ionocyty o 42 %, MCCs o 51 % a SCCs o 79 %, zatímco relativní exprese markerového genu pro „goblet" buňky se zvýšila o 18 %, ovšem tento nárůst nebyl statisticky významný (Obr. 23).

5.3.3 Potvrzení specifického působení NO na MCCs

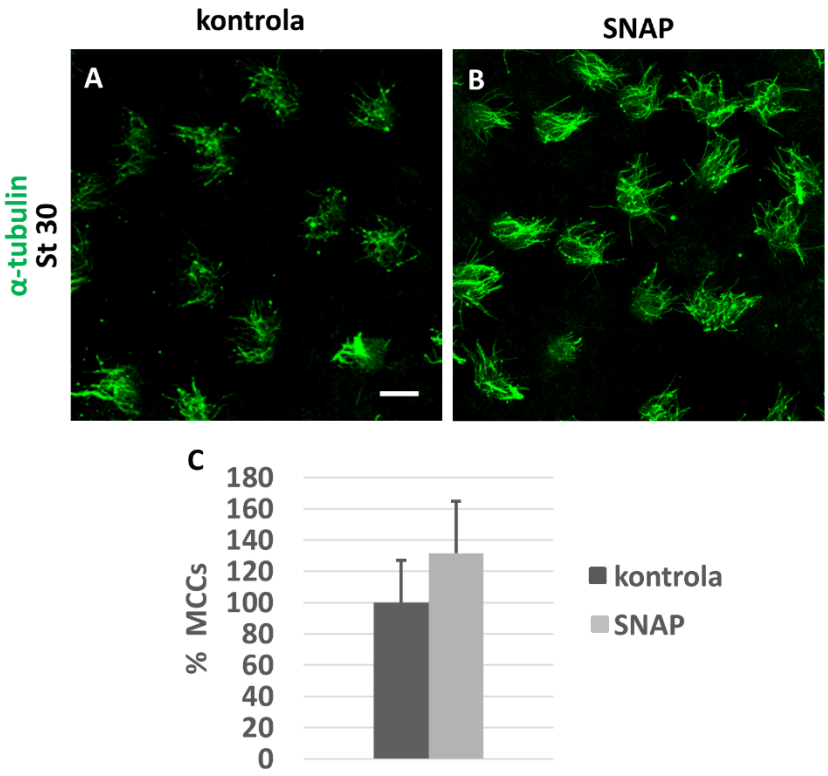
Pro ověření specifického působení NO na vývoj embryonálních epidermálních buněk byl do oplozených vajíček injikován donor NO – SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine), kdy se předpokládal opačný efekt než při inhibici produkce NO.

Použití NO donoru mělo za následek navýšení množství MCCs u embryí ve stádiu 30 o 32 % ve srovnání s kontrolními vzorky (Obr. 24).



Obr. 23 Vliv NO na vývoj jednotlivých buněčných typů epidermis

Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng *nNOS* MO a ekvivalentní množství kontrolního MO. Embryím ve stádiu 26 byla *post mortem* manuálně odebrána epidermis a použita pro zjištění relativní genové exprese markerových genů jednotlivých epidermálních buněčných typů: *itln2* (A), *foxi1e* (B), *tuba1a* (C) a *foxa1a* (D). U markerových genů *foxi1e, tuba1a* a *foxa1a* došlo k poklesu genové exprese, zatímco u *itln2* následkem inhibice NO došlo k nárůstu genové exprese. Pokožka z nejméně 5-ti embryí (ve stádiu 26) byla použita pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována studentovým nepárovým T-testem, který potvrdil statisticky významnou změnu ($P < 0.005$) u *foxi1e*, *tuba1a* a *foxa1a*. Relativní změna genové exprese *itln2* genu nevykazovala statistickou významnost ($P > 0.3$).

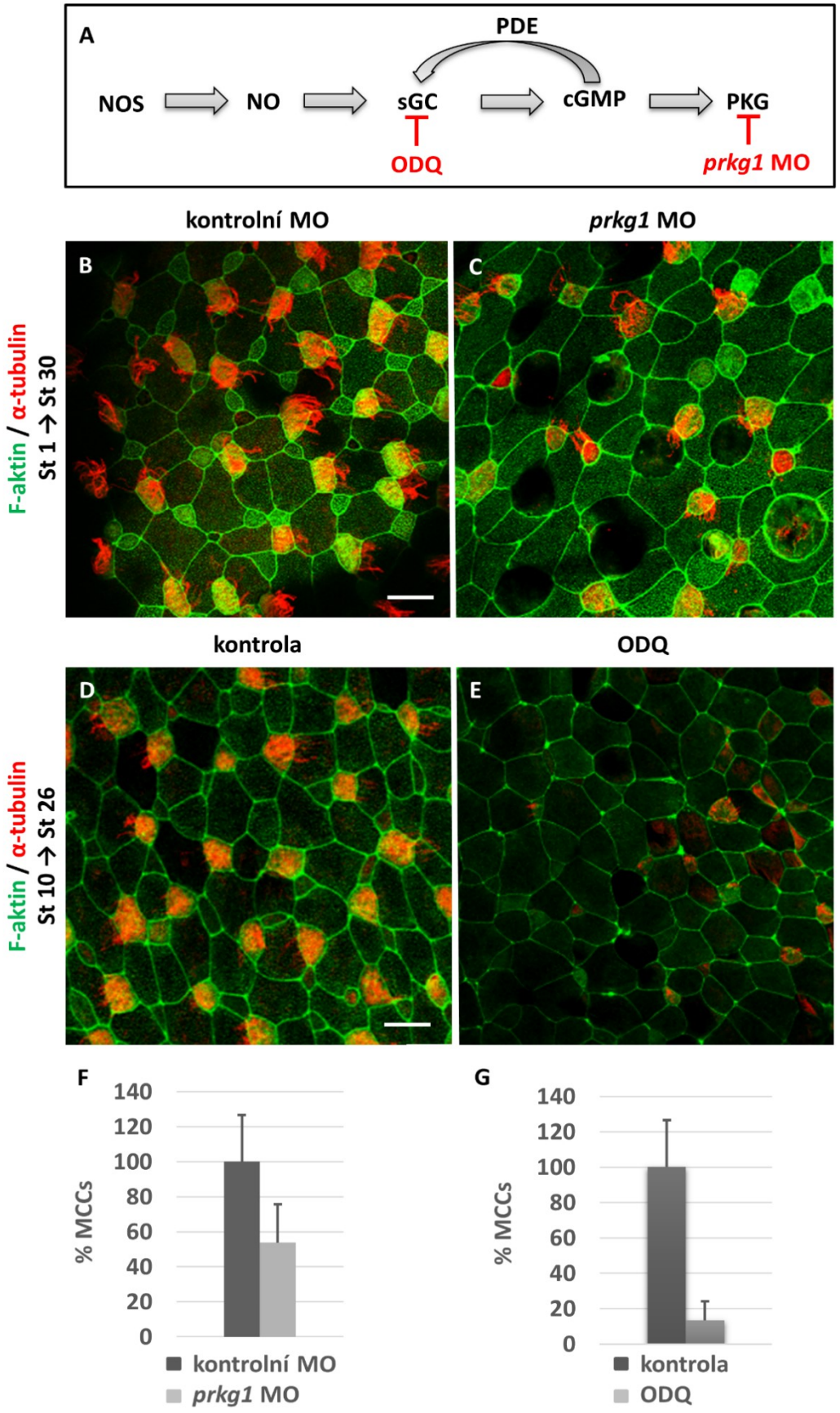


Obr. 24 Ověření specifického účinku NO na MCCs

Do oplozeného vajíčka byl injikován 1 nl 100 mM SNAP (B) a ekvivalentní množství DMSO jako kontrola (A). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 30 (A,B) a barvena protilátkou proti α-tubulinu pro detekci MCCs. Použití NO donoru vedlo k navýšení množství MCCs ve srovnání s kontrolními vzorky (C). Apikální povrch embryí byl vizualizován konfokální mikroskopií (zvětšení: 40x, měřítko: 20 µm). Kvantifikace buněk byla provedena programem ImageJ a Graphpad. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována studentovým T-testem, který potvrdil statisticky významnou změnu ($P < 0.04$).

5.4 Ověření působení NO na embryonální pokožku přes kanonickou NO-sGC-cGMP-PKG signální dráhu

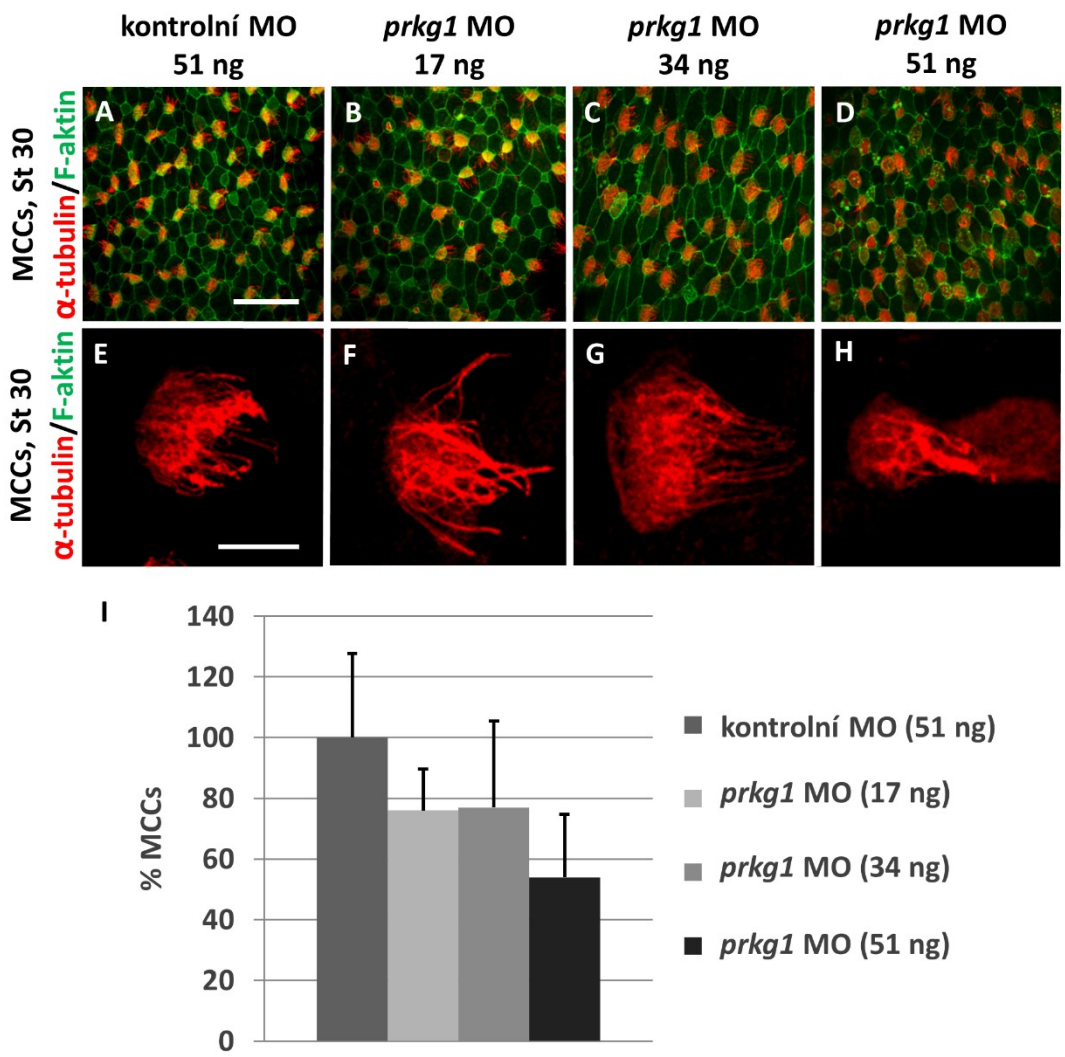
Hlavním mechanismem působení NO v organismu je aktivace signální dráhy sGC-cGMP-PKG (Lincoln *et al.*, 1998). Pro ověření působení NO na MCCs přes tuto signální dráhu, byla inhibována funkce sGC pomocí specifického chemického inhibitoru ODQ od stádia 10 (Obr. 25D,E) a funkce PKG pomocí MO proti tomuto genu od oplozeného vajíčka (Obr. 25B,C). U embryí s inhibovanou sGC došlo ke statisticky významnému poklesu množství MCCs o 87 % (Obr. 25G) a u embryí s inhibovaným PKG ke snížení počtu MCCs o 46 % (Obr. 25F).



Obr. 25 Ověření působení NO na embryonální pokožku přes kanonickou sGC-cGMP-PKG signální dráhu

Schématické znázornění studované dráhy se zvýrazněnými inhibitory, které byly v tomto experimentu použity (A). Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 51 ng kontrolního MO (B) a 51 ng *prkg1* MO (C). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 30 (B,C) a barvena protilátkou proti α-tubulinu pro detekci MCCs a značeným phalloidinem pro vizualizaci F-aktinu. Použití *prkg1* MO vedlo k poklesu množství MCCs ve srovnání s kontrolními vzorky (F). Embrya s odstraněnou vitelliní membránou byla inkubována v roztoku s inhibitorem ODQ (E) a ekvivalentním množství DMSO pro kontrolní vzorky (D) od stádia 10 do stádia 26. Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 26 (D,E) a barvena protilátkou proti α-tubulinu pro detekci MCCs a značeným phalloidinem pro vizualizaci F-aktinu. Inhibice cGC vedla k poklesu množství MCCs ve srovnání s kontrolními vzorky (G). Apikální povrch embryí byl vizualizován konfokální mikroskopií (zvětšení: 40x, měřítko: 20 μm). Kvantifikace buněk byla provedena programem ImageJ a Graphpad. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována studentovým T-testem, který potvrdil statisticky významnou změnu ($P < 0.005$).

Je vhodné zmínit, že v případě inhibice PKG pomocí *prkg1* MO bylo nutné použití vysokých koncentrací *prkg1* MO pro statisticky významné snížení množství MCCs – 51 ng *prkg1* MO vedlo k redukci množství MCCs o 46 % (Obr. 26D,H,I). V případě injikování 17 ng (Obr. 26B,F) a 34 ng *prkg1* MO (Obr. 26C,G) došlo ke snížení počtu MCCs o 24 % a 23 %, které ovšem nebylo statisticky významné (Obr. 26I).



Obr. 26 Efekt *prkg1* MO na MCCs

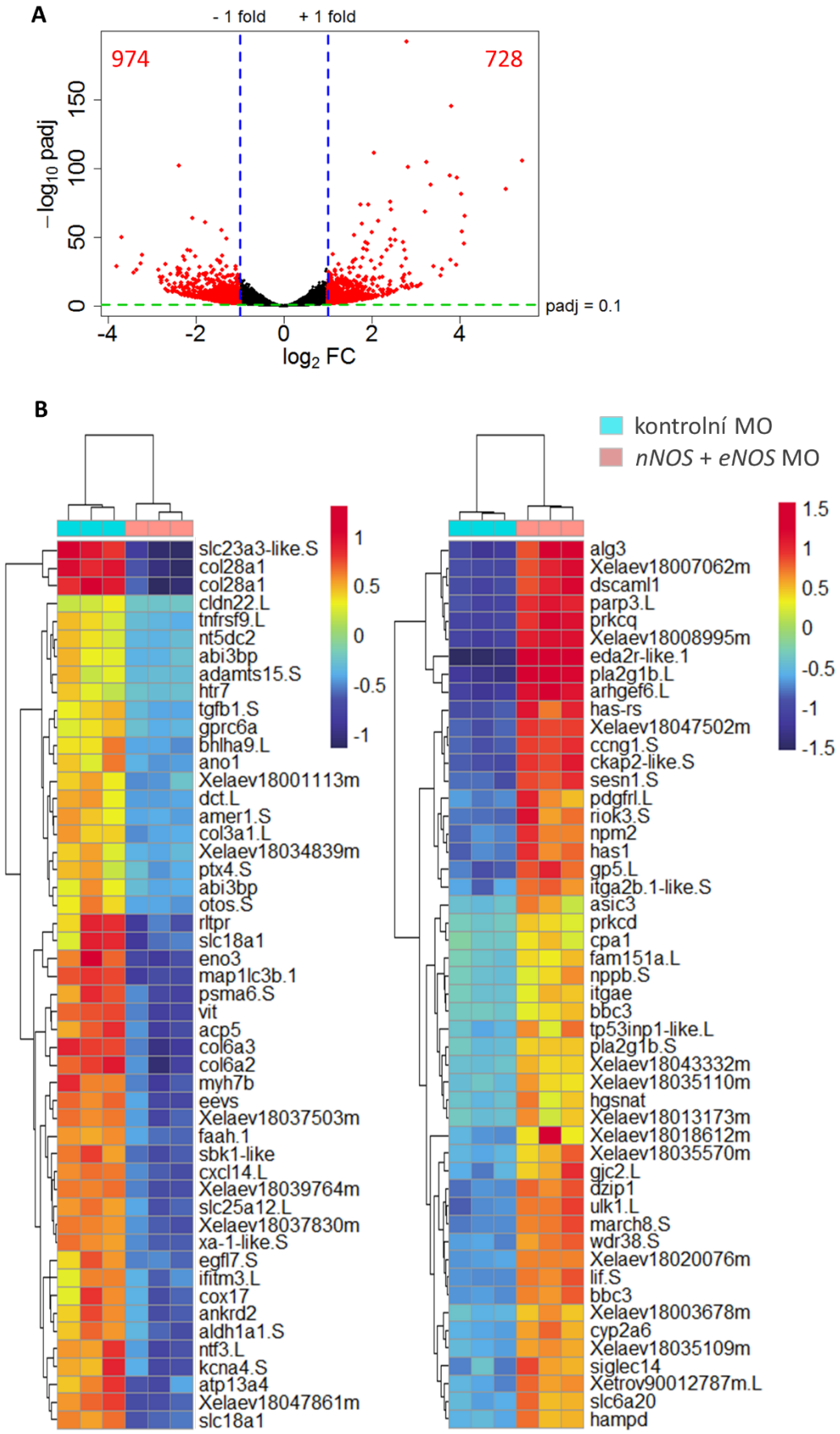
Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 51 ng kontrolního MO (A,E) a 17 (B,F), 34 (C,G) a 51 ng *prkg1* MO (D,H). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 30 (A-H) a barvena protilátkou proti α-tubulinu pro detekci MCCs (A-H) a značeným phalloidinem pro vizualizaci F-aktinu (A-D). Použití všech koncentrací *prkg1* MO vedlo k poklesu množství MCCs ve srovnání s kontrolními vzorky (I). Příklad struktury MCCs pro každou podmínku (E-H) – zvětšený výřez z nasnímaných dat. Apikální povrch embryí byl vizualizován konfokální mikroskopií. Kvantifikace buněk byla provedena programem ImageJ a Graphpad. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována jednosměrnou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) s následným Tukeyho testem, která potvrdila statisticky významnou změnu ($P < 0.005$) pouze u kontrolního MO x *prkg1* MO (51 ng). Zvětšení: 20x (A-D), měřítko: 100 µm (A-D), 25 µm (E-H).

5.5 Účinek inhibice NO na úrovni genové exprese

Bylo provedeno porovnání transkriptomů mezi embryi s inhibovanou produkcí NO (kombinace *eNOS* a *nNOS* MO, 1:1) a kontrolními vzorky. Byla detekována exprese 28 399 genů, znichž 1702 bylo regulovaných NO. Z těchto 1702 genů mělo v důsledku inhibice produkce NO zvýšenou expresi 728 genů a sníženou 974 genů (Obr. 27A). 50 transkriptů, u kterých došlo k největším změnám v genové expresi (snížená i zvýšená) v důsledku inhibice produkce NO jsou shrnuty v tzv. heat map analýze (Obr. 27B). Ukázalo se, že mnoho genů se sníženou expresí je spojeno s vývojem a funkcí pokožky. Výběr těchto genů je shrnut v Tab. 4. Jedná se zejména o kolageny (*col*), keratiny (*krt*), lamininy (*lam*) nebo matrix metalopeptidázy (*mmp*). Některé výsledky z RNA-seq analýzy byly potvrzeny metodou RT-qPCR (Tab. 4).

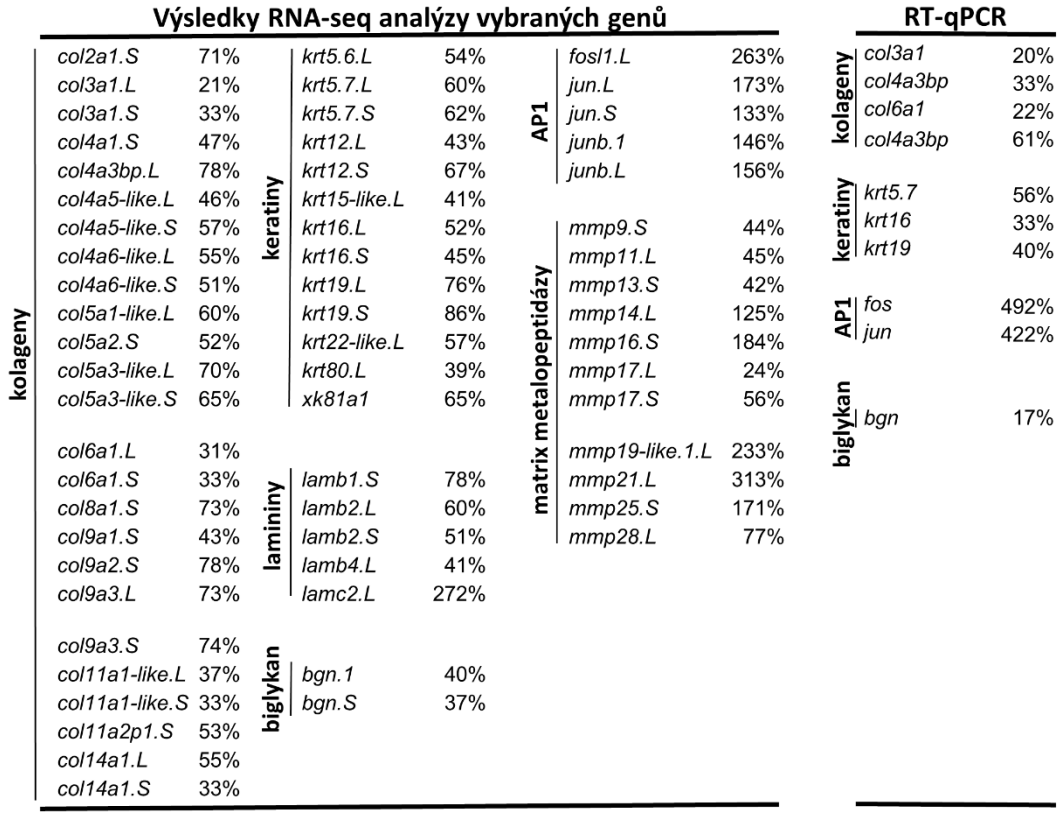
Kolageny byly navíc testovány na proteinové úrovni. Kontrolní embrya spolu s embryi s inhibovanou produkcí NO (kombinovaným působením *eNOS* a *nNOS* MO (2:1)) byla ve stádiu 26 barvena „Masson trichrome“ kitem (Obr. 28A). Výsledky ukazují redukci množství kolagenů o 30 % u embryí s inhibovanou produkcí NO ve srovnání s kontrolními vzorky (Obr. 28B).

U některých genů vedla inhibice produkce NO naopak ke zvýšené expresi. Pro pokožku mohou být zajímavé geny *jun* a *fos*, tvořící AP-1 komplex. Exprese obou těchto genů je v důsledku inhibice NO extrémně zvýšená (Tab. 4). Exprese genu *jun* byla kromě RT-qPCR testována i pomocí *in situ* hybridizace (Obr. 29). Kontrolní embrya a embrya s inhibovanou produkcí NO pomocí *eNOS* MO nevykazovala expresi *jun* v embryonální epidermis (ve středové oblasti embrya) ve stádiu 30 (Obr. 29A,B), zatímco použití *nNOS* MO (Obr. 22C) a kombinace *nNOS* a *eNOS* MO (Obr. 29D) vedla k pozitivnímu signálu pouze v určitých epidermálních buňkách.

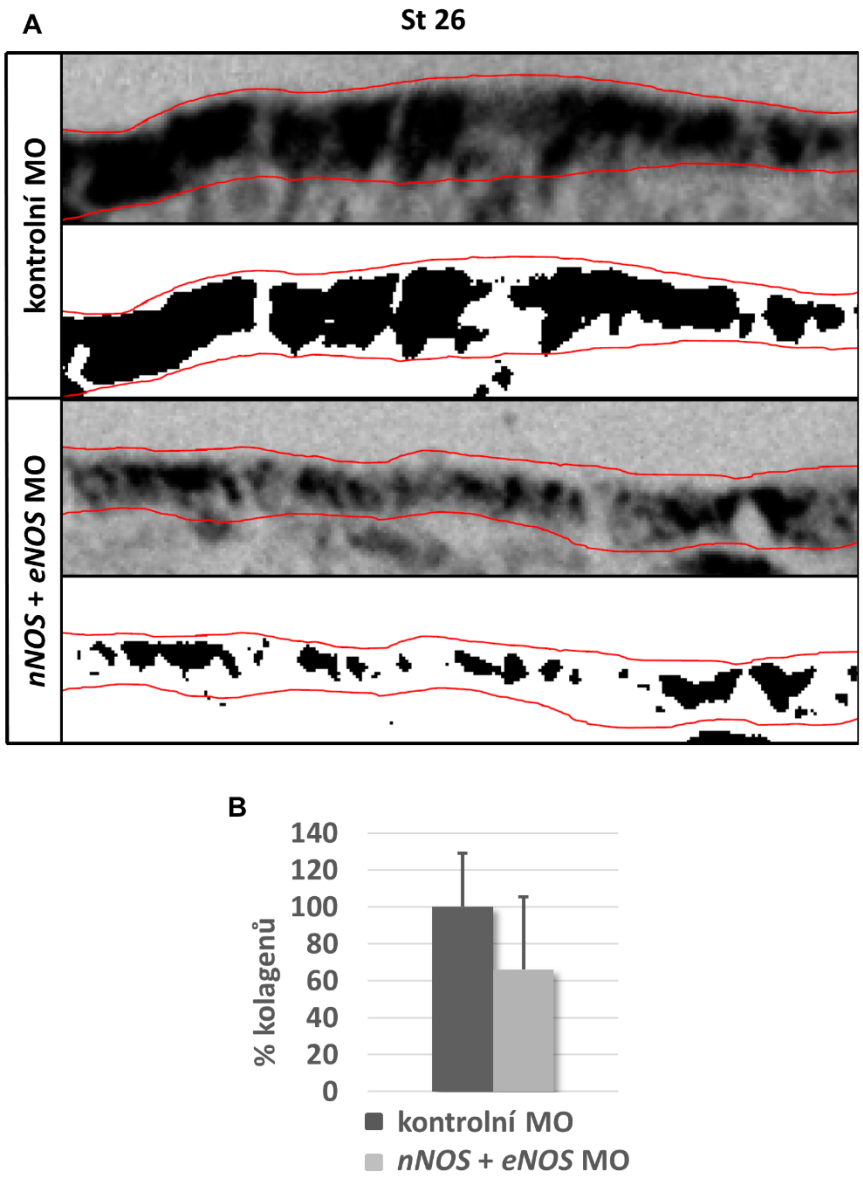

A
- 1 fold
+ 1 fold
974
728
padj = 0.1
$-\log_{10}$ padj
$\log_2$ FC
B
kontrolní MO
nNOS + *eNOS* MO
slc23a3-like.S
col28a1
col28a1
cldn22.L
tnfrsf9.L
nt5dc2
abi3bp
adamts15.S
htr7
tgfb1.S
gprc6a
bhlha9.L
ano1
Xelaev18001113m
dct.L
amer1.S
col3a1.L
Xelaev18034839m
ptx4.S
abi3bp
otos.S
rltpr
slc18a1
eno3
map1lc3b.1
psma6.S
vit
acp5
col6a3
col6a2
myh7b
eevs
Xelaev18037503m
faah.1
sbk1-like
cxcl14.L
Xelaev18039764m
slc25a12.L
Xelaev18037830m
xa-1-like.S
egfl7.S
ifitm3.L
cox17
ankrd2
aldh1a1.S
ntf3.L
kcna4.S
atp13a4
Xelaev18047861m
slc18a1
alg3
Xelaev18007062m
dscaml1
parp3.L
prkcq
Xelaev18008995m
eda2r-like.1
pla2g1b.L
arhgef6.L
has-rs
Xelaev18047502m
ccng1.S
ckap2-like.S
sesn1.S
pdgfrl.L
riok3.S
npm2
has1
gp5.L
itga2b.1-like.S
asic3
prkcd
cpa1
fam151a.L
nppb.S
itgae
bbc3
tp53inp1-like.L
pla2g1b.S
Xelaev18043332m
Xelaev18035110m
hgsnat
Xelaev18013173m
Xelaev18018612m
Xelaev18035570m
gjc2.L
dzip1
ulk1.L
march8.S
wdr38.S
Xelaev18020076m
lif.S
bbc3
Xelaev18003678m
cyp2a6
Xelaev18035109m
siglec14
Xetrov90012787m.L
slc6a20
hampd

Obr. 27 Transkriptomová RNA seq analýza u embryí s inhibovanou produkcí NO

Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng kontrolního MO a 17 ng *nNOS*+17 ng *eNOS* MO. RNA z celých embryí byla použita pro analýzu transkriptomu. Výsledky z DESeq2 prezentovány pomocí Volcano plot. Červeně zvýrazněné body představují transkripty (padj < 0.1) se změnou exprese větší než 2x (log_2 FC > 1 nebo < 1) (A). 50 transkriptů s největší změnou exprese v důsledku inhibice produkce NO prezentovaných v heat map (B).

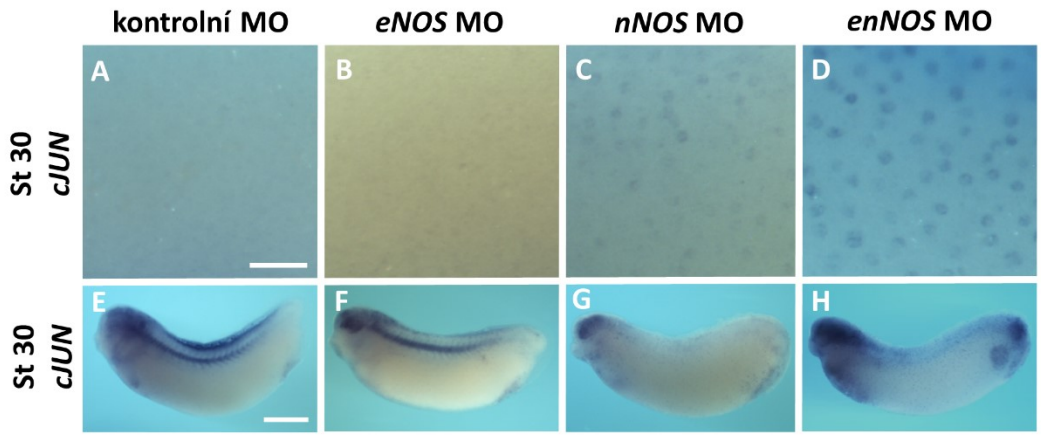


Tab. 4 Relativní změny genové exprese u embryí s inhibovanou produkcí NO ve srovnání s kontrolními vzorky (100 %)



Obr. 28 Vliv NO na množství kolagenů v epidermis

Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng kontrolního MO (A,D,G), 17 ng *nNOS* MO (B,E,H) a 34 ng *eNOS* MO (C,F,I). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 26 a následné parafínové řezy byly barveny Masson Trichrom kitem pro detekci kolagenů (A). Kvantifikace kolagenů byla provedena programem ImageJ a Graphpad. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována studentovým T-testem, který potvrdil statisticky významnou změnu ($P < 0.005$).



Obr. 29 Exprese *jun* ve stádiu 30

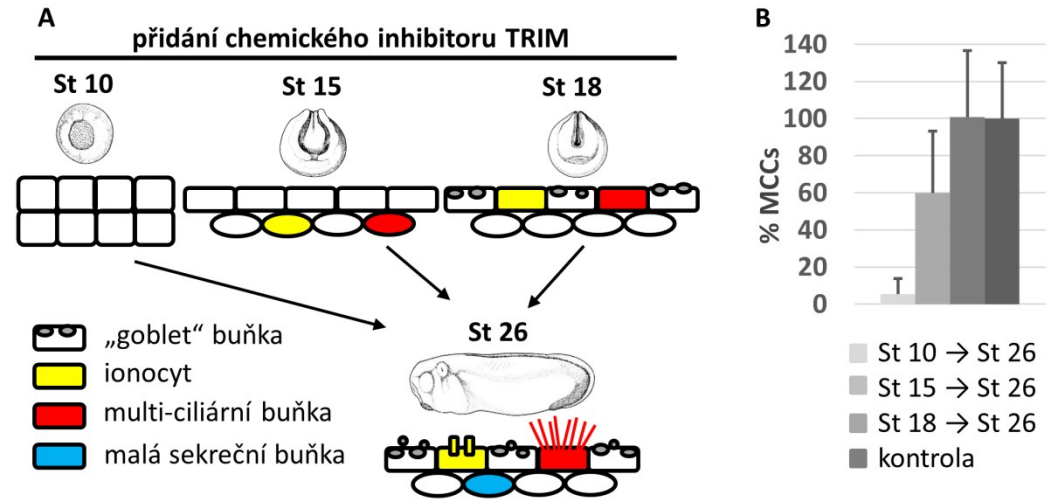
Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 51 ng kontrolního MO (A,E), 34 ng *eNOS* MO + 17 ng kontrolního MO (B,F), 17 ng *nNOS* MO + 34 ng kontrolního MO (C,G) a 34 ng *eNOS* MO + 17 ng *nNOS* MO (C,F,I). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 30 (A-H) a hybridizována se sondou proti *jun* (A-H). Pro identifikaci signálu v epidermis byla nafocena středová oblast embryí (A-D) i celá embrya (E-H). Povrch embryí i celá embrya byla nafocena makroskopem (zvětšení: 11.25x (A-D), 3.2x (E-H) měřítko: 50 µm (A-D), 1000 µm (E-H)).Inhibice produkce NO vedla k expresi *jun* v určitých buňkách epidermis. Zpracování dat bylo provedeno v programu ImageJ. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku.

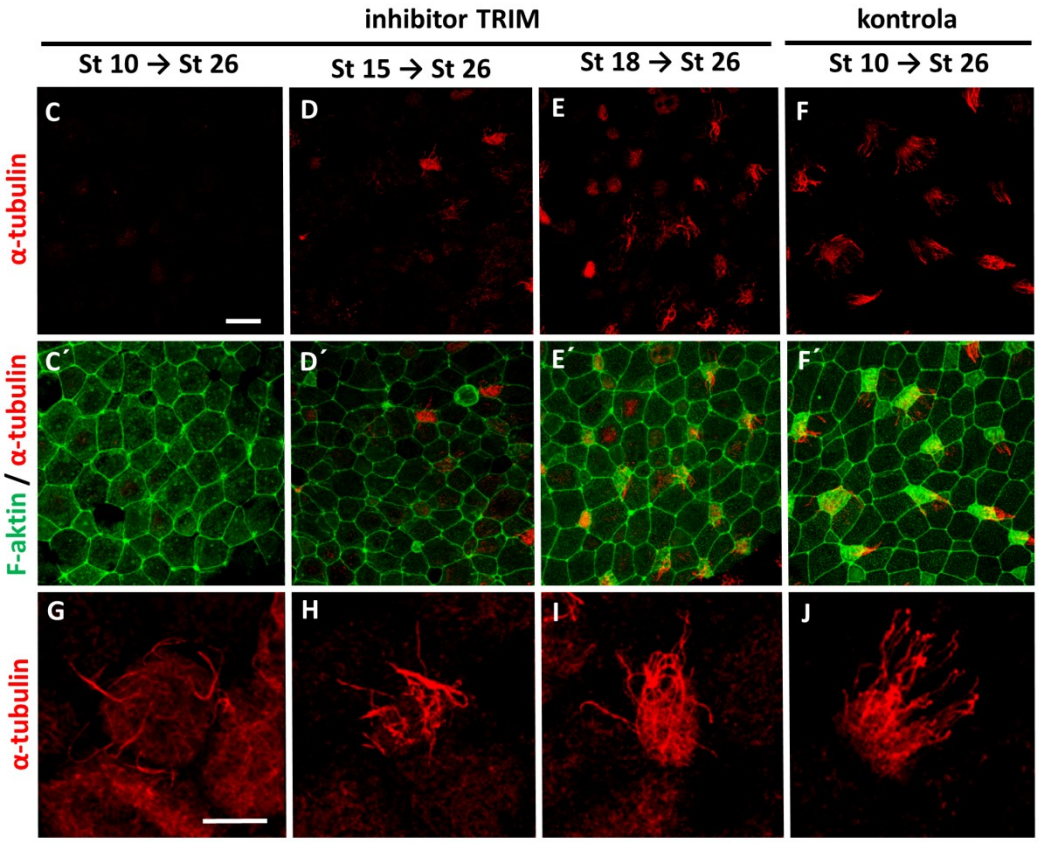
5.6 Zjištění vývojového stádia ve kterém je NO nezbytný pro vývoj MCCs

Z předchozích dat je zřejmá zásadní úloha NO pro vývoj MCCs. Jelikož NO ovlivňuje zejména buňky interkalující do vnější vrstvy epidermis, byla provedena časová analýza vlivu NO na vývoj MCCs. Embryím byla ve stádiu 10 manuálně odstraněna vitelinní membrána a poté byla embrya inkubována s chemickým inhibitorem NO (TRIM, 1-2-Trifluoromethylphenyl imidazole) od časné gastrulace – stádium 10 (Obr. 30C,C´,G), časné neurulace – stádium 15 (Obr. 30D,D´,H) a pozdní neurulace - stádium 18 (Obr. 30E,E´,F) viz. schématické znázornění experimentu (Obr. 30A). Kontrolní embrya byla od stádia 10 inkubována v DMSO (Obr. 30F,F´J). Embrya se nechala v pokojové teplotě přes noc vyvíjet do stádia 26, ve kterém jsou MCCs plně vyvinuté. Pomocí imunonohistochemického barvení bylo prokázáno, že NO je nezbytný pro správný vývoj MCCs zejména v časných vývojových stádiích. Embrya s inhibovanou produkcí NO od stádia 10 téměř postrádala MCCs ve stádiu 26 (Obr. 30C,C´). U těchto embryí došlo k poklesu množství MCCs o 95 % (Obr. 30B). Inhibice produkce NO během časné neurulace

vedla ke slabšímu efektu na MCCs (pokles o 40 %) (Obr. 30B) a inhibice produkce NO od pozdní neurulace neměla vliv na množství vyvinutých MCCs v embryonální pokožce (Obr. 30B).

Kromě redukce množství MCCs u embryí s inhibovanou produkcí NO od stádia 10 a 15 (Obr. 30G,H), měly vyvinuté MCCs u těchto embryí výrazně deformovanou strukturu cilií (ve srovnání s kontrolními vzorky). Inhibice produkce NO od stádia 18 nevedla k zásadní změně morfologie MCCs (Obr. 30I).

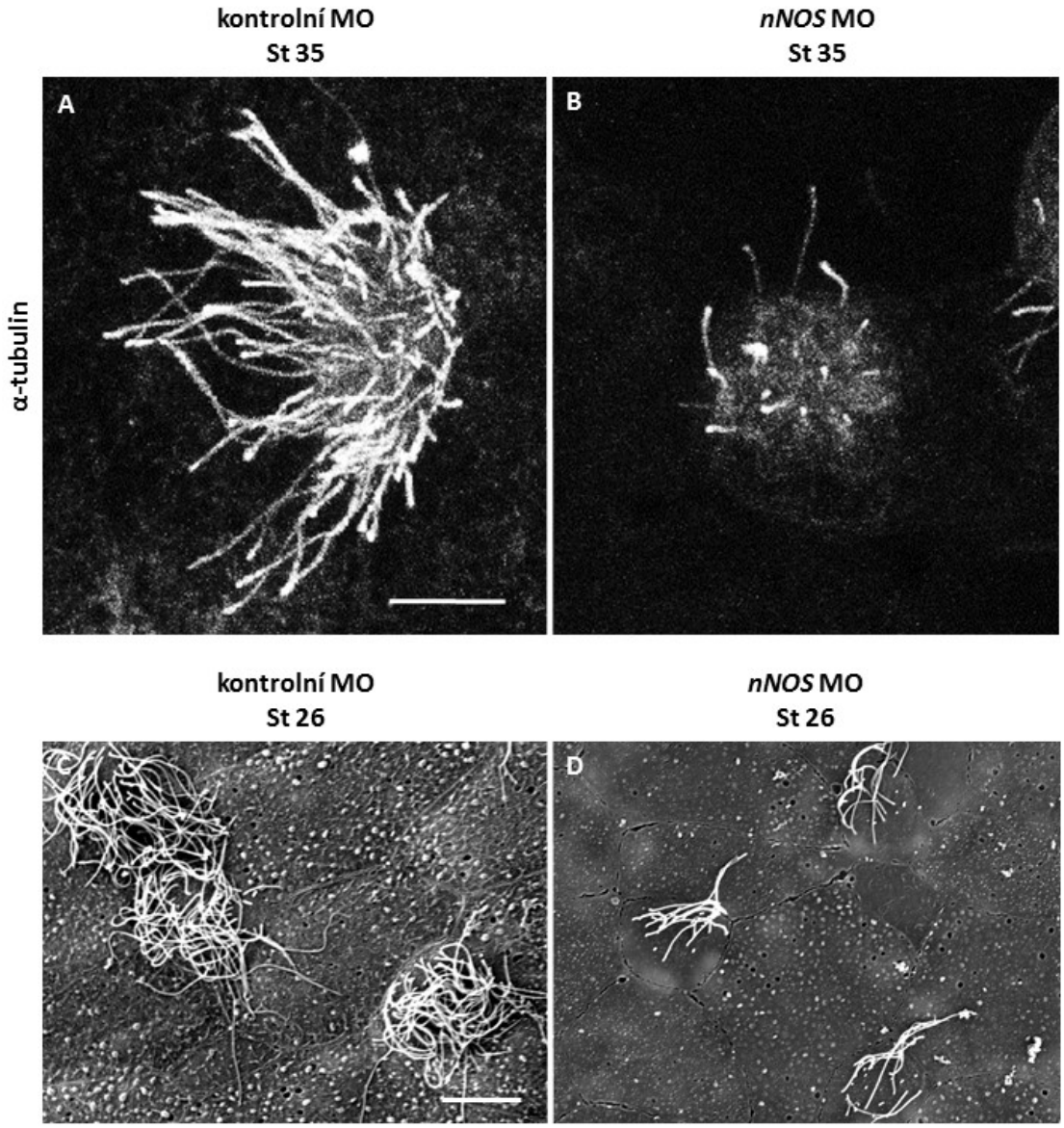




Obr. 30 Určení vývojového stádia, ve kterém je nezbytný NO

Schématické znázornění experimentu (A). Embryím byla manuálně odstraněna vitelinní membrána v časných vývojových stádiích. Produkce NO byla inhibována chemickým inhibitorem TRIM od stádia 10 (C,C´,G), 15 (D,D´,H) a 18 (E, E´, I). Kontrolní embrya byla inkubována v roztoku DMSO od stádia 10. Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 26 a barvena protilátkou proti α-tubulinu pro detekci MCCs a značeným phalloidinem pro vizualizaci F-aktinu. Apikální povrch embryí byl vizualizován konfokální mikroskopií (zvětšení: 40x, měřítko: 20 μm). Příklad morfologie MCCs pro každou podmínku (G-J). Kvantifikace buněk byla provedena programem ImageJ a Graphpad. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována jednosměrnou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) s následným Tukeyho testem, která potvrdila statisticky významnou změnu u kontrolních vzorků x TRIM od stádia 10 a 15 ($P < 0.03$) ovšem ne od stádia 18.

Rovněž inhibice pomocí *nNOS* MO vedla kromě poklesu množství MCCs k zásadním morfologickým změnám u tohoto typu buněk ve srovnání s kontrolními vzorky. U embryí s inhibovanou produkcí NO dochází k redukci množství cilií v rámci jedné buňky a cilie jsou kratší (Obr. 31). Tento strukturní fenomén byl potvrzen jak pomocí fluorescenční mikroskopie detekcí MCCs specifickou protilátkou proti α-tubulinu (Obr. 31A,B), tak pomocí skenovací elektronové mikroskopie (Obr. 31C,D). Stejně je tomu i v případě inhibice PKG, kdy dochází k redukci množství cilií na buňku (Obr. 26H). Nižší koncentrace *prkg1* MO nemají vliv na strukturu cilií (Obr. 26E-G), ovlivňují pouze celkové množství MCCs na povrchu embrya.

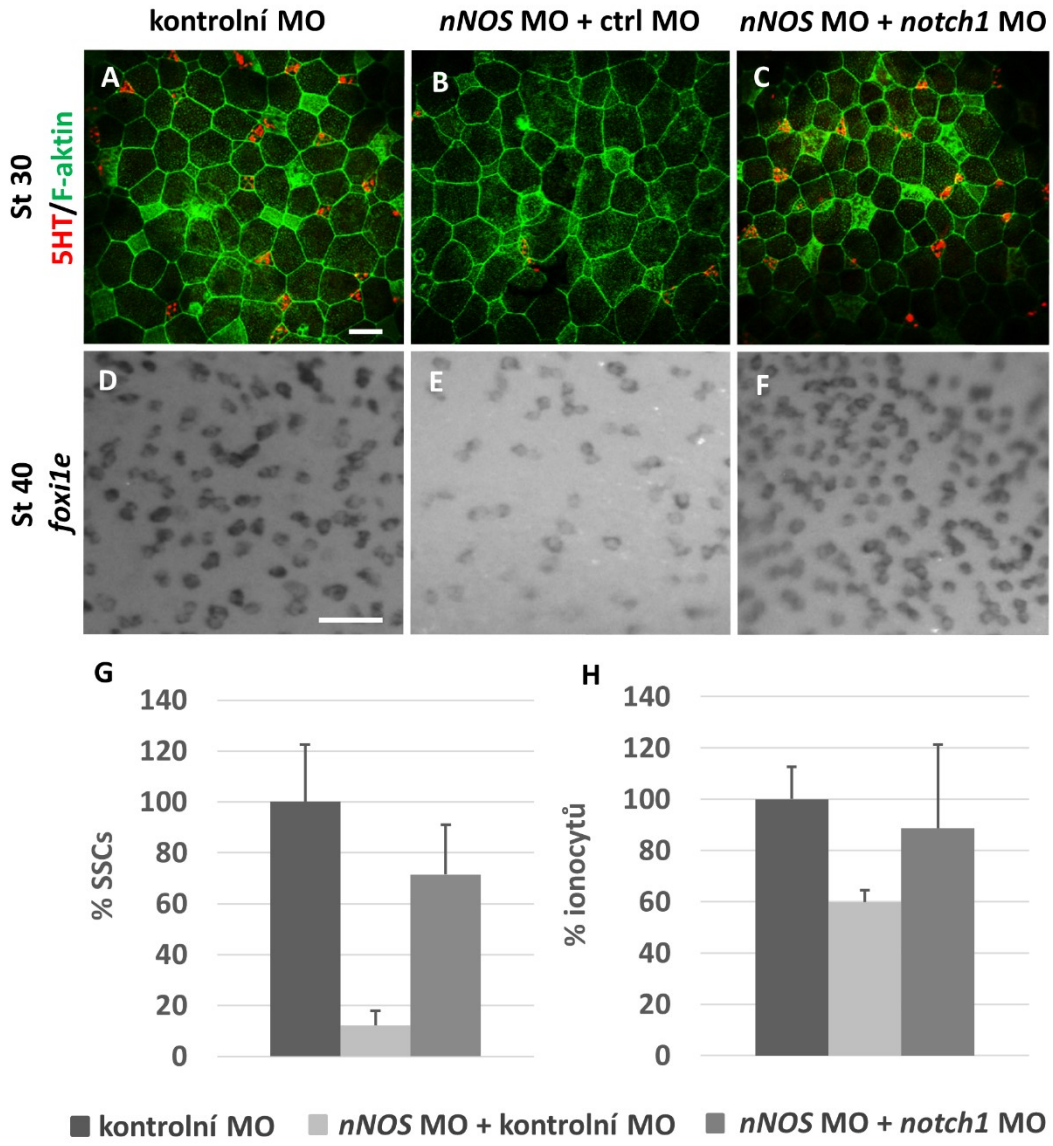


Obr. 31 Struktura cilií u embryí s inhibovanou produkcí NO a u kontrolních embryí

Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 17 ng kontrolního MO (A,C) a 17 ng *nNOS* MO (B,D). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 35 (A,B) a ve stádiu 26 (C,D). MCCs byly barveny protilátkou proti α-tubulinu (A,B). Apikální povrch embryí byl vizualizován konfokální mikroskopií (A,B) (zvětšení: 40x, měřítko: 20 μm). MCCs u embryí ve stádiu 26 byly vizualizovány elektronovým skenovacím mikroskopem (C,D) (zvětšení: 2000x, měřítko: 10 μm). Zpracování dat bylo provedeno v programu ImageJ. Nejméně 3 embrya byla použita pro každou podmínku.

5.7 Souvislost NO a Notch signální dráhy

Jelikož produkce NO je nezbytná během časné gastrulace, kdy dochází ke specifikaci epidermálních buněk Notch zprostředkovanou laterální inhibicí, byla testovaná souvislost NO s Notch signalizací, kdy inhibice Notch dráhy vede k nadprodukci prekurzorů interkalujících buněk, zatímco endogenní aktivace k jejich redukci (Werner and Mitchell, 2012). Pro objasnění propojení NO a Notch dráhy bylo zvoleno kombinované působení *nNOS* MO (vedoucí ke snížení množství epidermálních typů interkalujících do vnější vrstvy) a *notch1* MO (mající za následek nadprodukci interkalujících epidermálních typů buněk) (Obr. 32). U získaných embryí byly studovány početní rozdíly SSCs imunohistochemickým barvením ve stádiu 30 (Obr. 32A-C) a ionocytů pomocí *in situ* hybridizace ve stádiu 40 (Obr. 32D-F). Kombinované působení *nNOS* MO a *notch1* MO (1:1) vedlo ke statisticky významnému navrácení počtu SSCs o 59 % (Obr. 32C,G) a ionocytů o 29 % (Obr. 32F,H) ve srovnání se samostatným působením *nNOS* MO, které vedlo k redukci ionocytů o 40 % (Obr. 32E,H) a snížení množství SSCs o 88 % (Obr. 325B,G) ve srovnání s kontrolními embryi.



Obr. 32 Souvislost NO a Notch signální dráhy

Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng kontrolního MO (A,D), 17 ng *nNOS* MO + 17 ng kontrolního MO (B,E) a 17 ng *nNOS* MO + 17 ng *notch1* MO (C,F). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 30 (A-C) a ve stádiu 40 (D-F). Embrya ve stádiu 30 byla barvena protilátkou proti 5HT pro detekci SSCs a značeným phalloidinem pro vizualizaci F-aktinu (A-C). Embrya ve stádiu 40 byla hybridizována se sondou proti *foxi1e* pro detekci ionocytů (D-F). Povrch embryí ve stádiu 30 byl vizualizován konfokálním mikroskopem (A-C), (zvětšení: 40x, měřítko: 20 µm) a povrch embryí ve stádiu 40 byl nasnímán makroskopem (zvětšení 11.25x, měřítko: 50 µm). Inhibice produkce NO pomocí *nNOS* MO + kontrolního MO (B,E) měla za následek výraznou redukci množství SSCs (G) i ionocytů (H) ve srovnání s kontrolními vzorky. Kombinace *nNOS* MO + *notch1* MO vedla k částečnému navrácení počtu SSC (G) a ionocytů (H) ve srovnání s embryi injikovanými kombinací *nNOS* MO + kontrolním MO. Kvantifikace buněk byla provedena programem ImageJ. Nejméně 5 embryí bylo použito pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována jednosměrnou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) s následným Tukeyho testem. Analýza ukázala statisticky

významnou změnu SSCs ($P < 0.005$) u kontrolní MO x *nNOS* MO + kontrolní MO a u *nNOS* MO + kontrolní MO x *nNOS* MO + *notch1* MO. Statisticky významná změna SSCs nebyla detekována u kontrolní MO x *nNOS* MO + *notch1* MO. V případě ionocytů bylo $P < 0.2$ (kontrolní MO x *nNOS* MO + kontrolní MO). $P < 0.7$ (kontrolní MO x *nNOS* MO + *notch1* MO), $P < 0.35$ (*nNOS* MO + kontrolní MO x *nNOS* MO + *notch1* MO).

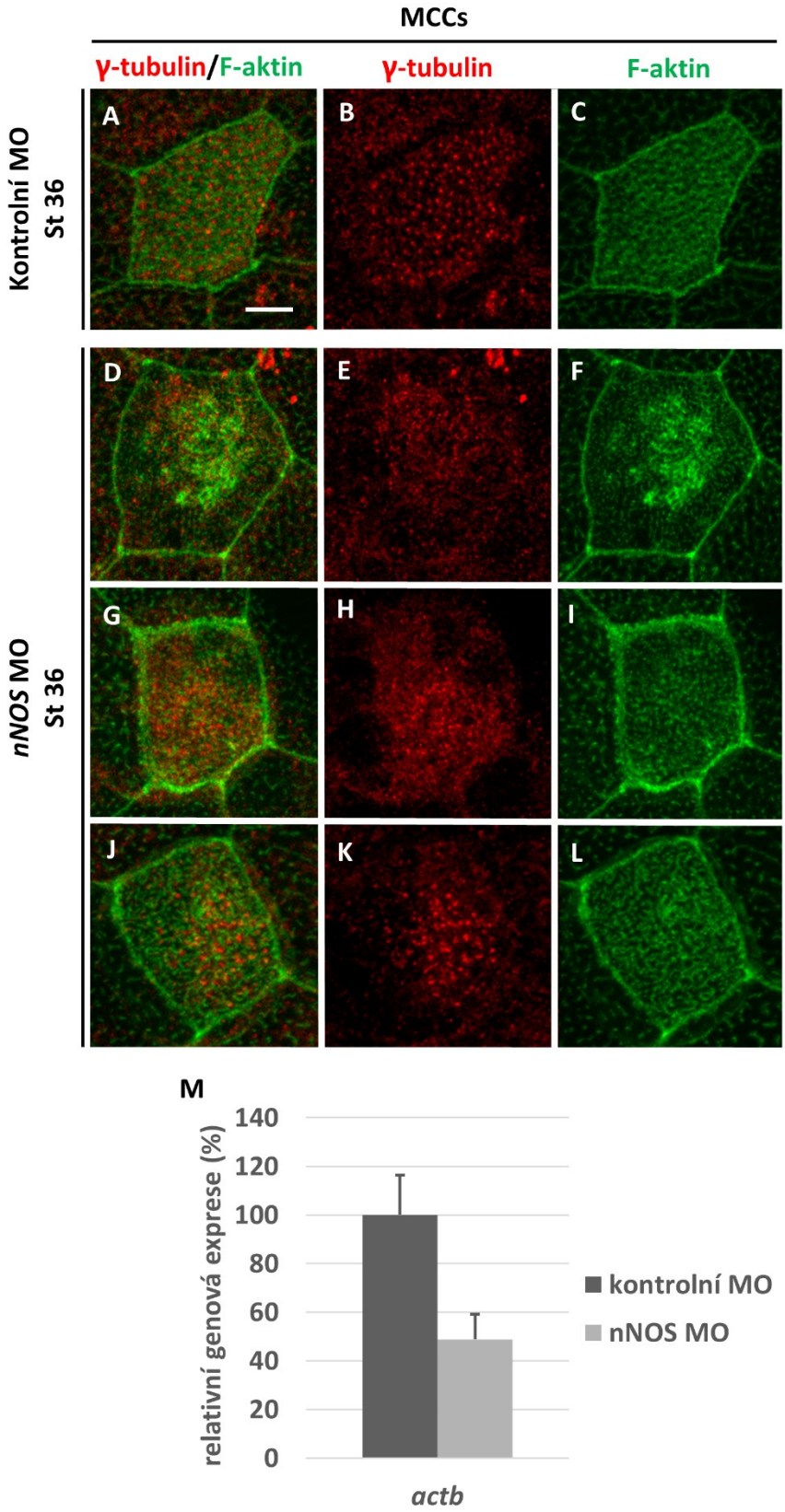
5.8 Působení NO na proces multiciliogeneze

5.8.1 Vliv NO na tvorbu bazálních tělísek a aktinu

Z předchozích výsledků je jasná zásadní úloha NO pro vývoj MCCs. Embrya s inhibovanou produkcí NO vykazovala redukované množství cilií v rámci jedné buňky, s kratší délkou zbylých cilií (Obr. 31). Jelikož axonema vzniká z tzv. bazálních tělísek, byl testován vliv NO na tyto struktury pomocí imunohistochemického barvení (bazální tělíska byla barvena protilátkou proti γ-tubulinu) (Obr. 33).

Bazální tělíska kontrolních embryí byla ve stádiu 36 (kdy jsou MCCs plně vyvinuté a funkční) pravidelně roztoušena v celém apikálním povrchu MCCs (Obr. 33A-C). U embryí s inhibovanou produkcí NO nedocházelo k pravidelnému roztroušení bazálních tělísek (Obr. 33D-L). Bazální tělíska byla často akumulována v centrální oblasti MCCs (Obr. 33J,K) nebo byla špatně rozpoznatelná (Obr. 33D,E,G,H). Navíc u embryí s inhibovanou produkcí docházelo k výrazným změnám na úrovni aktinu (Obr. 33D,F,G,I,J,L), který byl mnoha případech akumulován v centrální oblasti MCCs (Obr. 33D,F).

Tvorba aktinové sítě je nezbytná pro ukotvení bazálních tělísek v apikální oblasti MCCs a tím zásadně ovlivňuje tvorbu axonemy. Kromě strukturních změn aktinové sítě v MCCs vedla inhibice NO pomocí *nNOS* MO ke statisticky významnému poklesu relativní genové exprese *β-aktinu* (Obr. 33M).



Obr. 33 Vliv NO na tvorbu bazálních tělísek a aktinu v MCCs embryonální epidermis

Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 17 ng kontrolního MO (A-C) a 17 ng *nNOS* MO (D-L). Embrya byla fixována 4% PFA ve stádiu 37 (A-L). Embrya ve stádiu 37 byla barvena protilátkou proti γ-tubulinu (A,B,D,E,G,H,J,K) a značeným phalloidinem vizualizující F-aktin (A,C,D,F,G,I,J,L).

Apikální povrch embryí byl vizualizován konfokální mikroskopií (zvětšení: 63x, měřítko: 10 μm). Embryím ve stádiu 26 byla *post mortem* manuálně odebrána epidermis a použita pro zjištění relativní genové exprese *actb* (M). Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng *nNOS* MO a ekvivalentní množství kontrolního MO. Pokožka z nejméně 5-ti embryí (ve stádiu 26) byla použita pro každou podmínku. Experimentální data byla analyzována studentovým nepárovým T-testem, který potvrdil statisticky významnou změnu ($P < 0.0001$)

5.8.2 Účinek inhibice NO na úrovni genové exprese

Pro potvrzení účinku inhibice NO na proces multiciliogeneze byla zvolena metoda RT-qPCR. Usmrceným embryím ve stádiu 26 byla manuálně odebrána pokožka, která byla použita pro studium relativní exprese vybraných genů, zásadních během tohoto procesu. U embryí s inhibovanou produkcí MO došlo ve srovnání s kontrolními vzorky ke statisticky významnému snížení relativní exprese genů *cep152, cetn1, ddl1, dp1, e2f4, gmnc, myb, rhoA, rRAS, rcsd1* a *tp73* (Tab. 5). U genů *ezr* a *notch1* nedocházelo ke změně genové exprese, zatímco exprese genů *cp110* a *mcidas* se u embryí s inhibovaným NO statisticky výrazně zvýšila.

RT-qPCR	kontrolní MO	*nNOS* MO	P-value
bbof1 L	100%	77%	0.1296
cep152 L	100%	65%	0.0031
cep152 S	100%	68%	0.0116
cetn1 L	100%	55%	0.0002
cetn1 S	100%	52%	0.0003
cp110 L	100%	253%	<0.0001
cp110 S	100%	109%	0.8647
dll1	100%	42%	0.0097
dp1 (tfdp1) L	100%	85%	0.4321
dp1 (tfdp1) S	100%	31%	0.0127
e2f4 L	100%	79%	0.0389
e2f4 S	100%	61%	0.001
e2f5 L	100%	123%	0.1388
e2f5 S	100%	90%	0.3612
ezr L	100%	99%	0.9647
gmnc L	100%	9%	0.0002
gmnc S	100%	29%	0.015
mcidas	100%	181%	0.0447
myb S	100%	54%	0.0009
notch1	100%	103%	0.8898
rhoA L	100%	63%	0.0453
rhoA S	100%	72%	0.0535
rRAS S	100%	64%	0.0127
rcsd1 S (CapZIP)	100%	71%	0.0227
tp73L	100%	59%	0.0153
tp73S	100%	64%	0.1036

Tab. 5 Relativní změny genové exprese v epidermis s inhibovanou produkcí NO

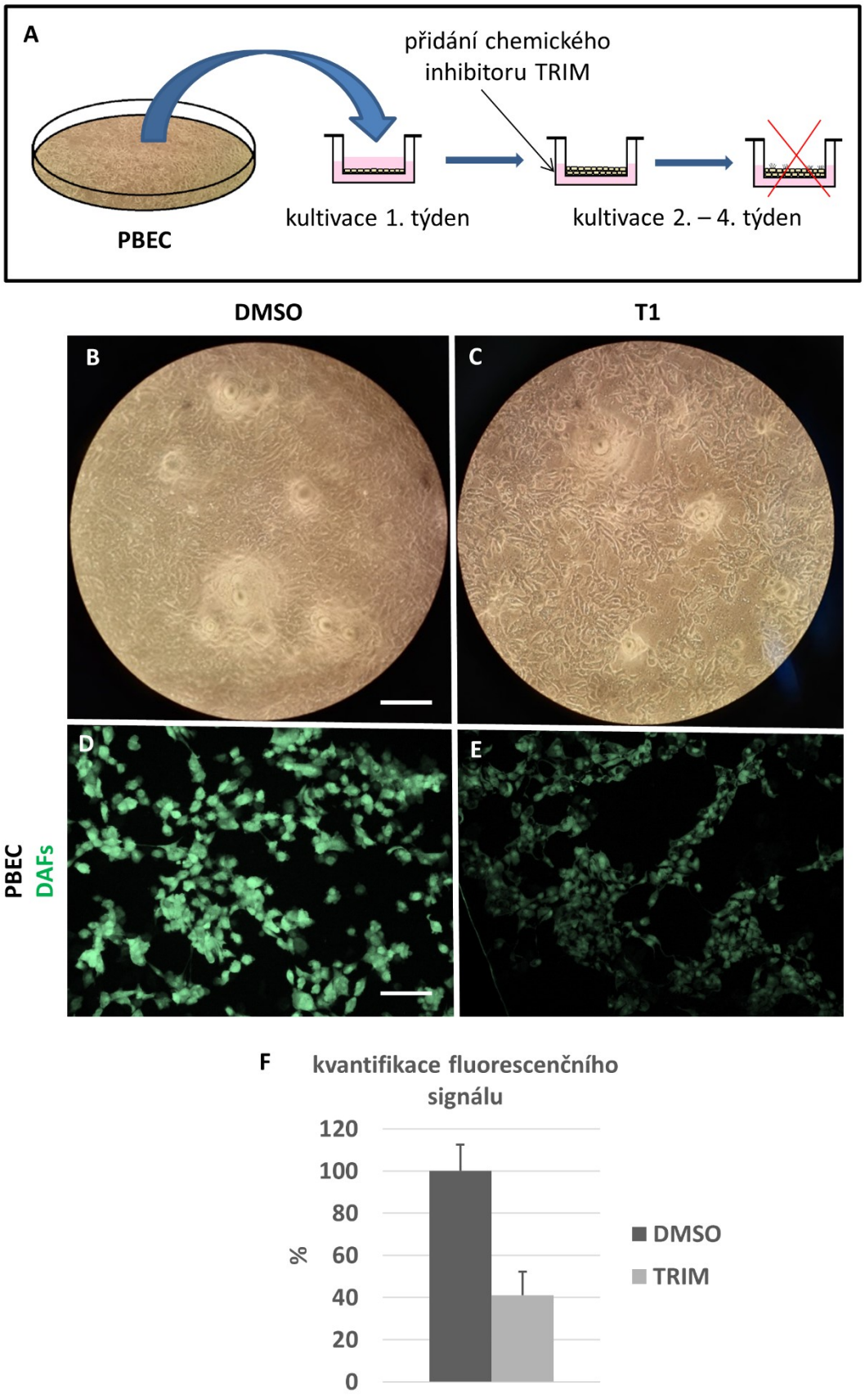
Do oplozeného vajíčka bylo injikováno 34 ng kontrolního MO a 34 ng *nNOS* MO. RNA z manuálně odebrané pokožky (embrya ve stádiu 26) byla použita pro analýzu relativní genové exprese pomocí RT-qPCR vybraných genů zásadních pro proces multiciliogeneze. Experimentální data byla analyzována studentovým nepárovým T-testem.

5.9 Úloha NO v lidském bronchiálním epitelu

Embryonální pokožka drápatky vodní se stává vhodným modelem pro studium lidských mukozních a mukociliárních epitelů. Z toho důvodu byla role NO testována také v lidském bronchiálním epitelu. Lidské primární bronchiální epiteliální buňky (PBEC) byly kultivovány s chemickým inhibitorem syntáz NO (TRIM) viz. schématické znázornění experimentu (Obr. 34A). Z důvodu horšího přežívání ovlivněných PBEC, byly vzorky sbírány před plnou diferenciací do bronchiálního plicního epitelu (Obr. 34B,C). Inhibice NO byla ověřena barvením PBEC indikátory NO – DAF-FM a DAF-2DA (1:1). U PBEC s inhibovanou produkcí NO došlo ke statisticky významnému poklesu fluorescenčního signálu o 59 % ve srovnání s kontrolními vzorky (Obr. 34D-F). Ovlivněné PBEC jsou navíc vizuálně menší než kontrolní buňky.

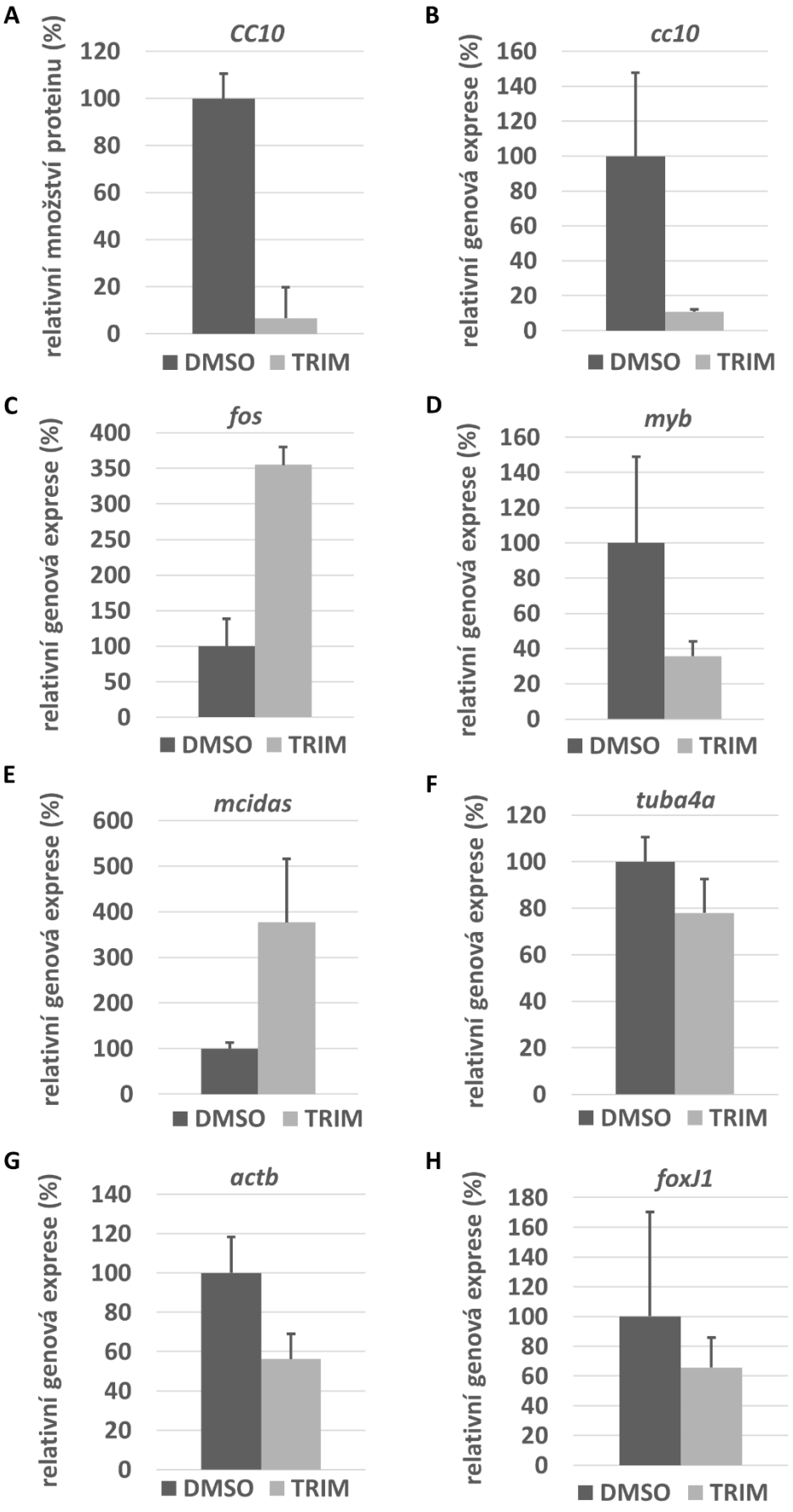
Srovnání účinku NO na PBEC bylo provedeno metodou RT-qPCR (Obr. 35). Inhibice NO u PBEC vede ke statisticky významnému nárůstu relativní exprese genů *fos* (o 254 %) a *mcidas* (o 276 %), snížení exprese genů *cc10* (*scgb1a1*) (o 89 %) a *actb* (o 44 %) a ke statisticky nevýznamnému snížení genu *myb* (o 64 %) a markerových genů MCCs *tuba4a* (o 22 %) a *foxJ1* (o 35 %).

Pokles markerového genu *cc10* pro Clara buňky byl navíc potvrzen na proteinové úrovni metodou ELISA, kdy u PBEC s inhibovanou produkcí NO došlo ke statisticky významnému snížení množství CC10 o 93 %.



Obr. 34 Kultivace PBEC a ověření účinku chemického inhibitoru TRIM

Schématické znázornění experimentu (A). PBEC buňkám (konfluence 90 – 95%) bylo odebráno PneumaCult™ Ex médium a do bazální komory byl přidán 1 ml kompletního PneumaCult™ ALI média s 1 mM TRIM (C). Kontrolním vzorkům bylo do média přidáno ekvivalentní množství DMSO a buňky byly inkubovány po dobu nejméně 1 týdne (B). Buňky byly *in vivo* inkubovány v roztoku s indikátorem NO (DAF-FM+DAF-2DA, 1:1), poté opláchnuty PBS a fixovány v 4% PFA (D,E). Experimentální data byla analyzována studentovým nepárovým T-testem, který potvrdil statisticky významnou změnu ($P < 0.0001$). Měřítko: 75 μm (D,E), 150 μm (B,C), Zvětšení: 10x (B,C), 20x (D,E).



Obr. 35 Relativní změna genové exprese v důsledku inhibice NO

PBEC buňkám (konfluence 90 – 95%) bylo odebráno PneumaCult™ Ex médium a do bazální komory byl přidán 1 ml kompletního PneumaCult™ ALI média a 1 mM TRIM. Kontrolním vzorkům bylo do média přidáno ekvivalentní množství DMSO a buňky byly inkubovány po dobu nejméně 1 týdne. Médium z bazální komory bylo použito pro analýzu relativního množství proteinu CC10 metodou ELISA (A). RNA z PBEC byla použita pro analýzu relativní exprese vybraných genů (*cc10, fos, myb, mcidas, tuba4a, actb a foxJ1*) pomocí RT-qPCR (B-H). Experimentální data byla analyzována studentovým nepárovým T-testem. $P < 0.0001$ (A), $P < 0.05$ (B,C,E,G), $P = 0.0511$ (D), $P = 0.1$ (F), $P = 0.46$ (F)

6 Diskuze

Oxid dusnatý (NO) je bezbarvý plyn, který má v organismu významnou roli. Tento radikál ve fyziologické (nízké) hladině reguluje biologické procesy, jako je kontrola krevního tlaku, neurotransmise nebo imunitní odpověď organismu (Clough, 1999; Baranano *et al.*, 2001; Kellogg *et al.*, 2005). Produkce NO byla nedávno nalezena ve vyvíjející se pokožce drápatky vodní a lidském plicním epitelu (Furchgott and Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987; Gonzalez-Hernandez and Rustioni, 1999; Zhu *et al.*, 2008; Jacox *et al.*, 2014; Jackson *et al.*, 2015; Tomankova *et al.*, 2017). Je zajímavé, že přestože je NO často spojován s lidskými nemocemi mukociliárního epitelu, jeho přesná úloha v této tkáni nebyla plně objasněna. Jelikož embryonální pokožka drápatky vodní se ukázala jako vhodný model pro studium mukózních a mukociliárních epitelií člověka, byla vybrána pro studium úlohy NO v rámci tohoto projektu. Velkou výhodou embryí drápatky vodní je jejich vývoj ve vnějším prostředí, snadná manipulace a získání velkého množství materiálu pro výzkum.

Působení NO během vývoje embryonální epidermis

Díky zapojení NO do procesu hojení (Schaffer *et al.*, 1996; Stallmeyer *et al.*, 1999), není překvapivá jeho masivní produkce následkem poranění (Obr. 12). Rozsáhlá charakterizace epidermálního NO během embryonálního vývoje ukázala schopnost embrya drápatky vodní produkovat NO již v časných vývojových stádiích (Obr. 8,9), ovšem v mnohen menší míře, než je tomu při poranění. Časná vývojová stádia postrádají jak imunitní tak cévní systém, což naznačuje novou úlohu NO ve vývoji organismu. Detailní imunohistochemická analýza ukázala produkci NO zejména v ionocytech a v multi-ciliárních buňkách (MCCs) (Obr. 17). Navíc během vývoje dochází k akumulaci tohoto radikálu v apikální oblasti těchto buněk (Obr. 11), a tato asymetrická lokalizace NO by mohla výrazně ovlivňovat vývoj, diferenciaci nebo polaritu MCCs a ionocytů. Je zajímavé, že produkce NO nebyla detekována v malých sekrečních buňkách (SSCs), které se stejně jako ionocyty a MCCs interkalují do vnější vrstvy epidermis (Obr. 17). Na rozdílnost produkce NO v SSCs, ve srovnání s ionocyty a MCCs, by mohla mít vliv jejich pozdější specifikace a interkalace do vnější epidermální vrsty.

Důležitá role NO ve vývoji embryonální epidermis je podpořena expresí konstitutivních syntáz NO (eNOS a nNOS), které jsou na úrovni mRNA roztroušeně exprimovány v embryonální pokožce drápatky vodní (Obr. 13). Použití specifické protilátky proti nNOS navíc prokázalo přítomnost této syntázy v buňkách produkujících NO (v MCCs a ionocytech) (Obr. 18). Konstitutivní syntázy NO (eNOS a nNOS) byly již v minulosti také detekovány v MCCs lidské plicní tkáně, ale jejich přesná role nebyla zcela prokázána (Jackson et al., 2015). Je ovšem známo, že NO může regulovat frekvenci kmitání cilií, což zásadně ovlivňuje transport mukózního hlenu například v plicním epitelu (Li et al., 2000; Jaio et al., 2010). V rámci této práce byla poprvé propojena přítomnost NO syntáz v MCCs spolu s produkcí NO v axonemách MCCs, což pravděpodobně významně souvisí s regulací frekvence kmitání cilií (publikace v přípravě).

Časná produkce NO v ionocytech a MCCs naznačuje jeho zásadní roli během vývoje embryonální pokožky drápatky vodní. V rámci tohoto projektu se předpokládalo, že eNOS a nNOS udržují fyziologické množství NO v buňkách pro zajištění vývoje pokožky. Pro potvrzení této hypotézy byla provedena funkční analýza NO v embryonální epidermis. Pomocí morpholino oligonukleotidů (MO) proti *nNOS* a *eNOS* byla specificky redukována produkce NO v embryích drápatky vodní, vedoucí k výrazným fenotypovým změnám nejen v rámci pokožky (Obr. 19).

Hlavním znakem u embryí s inhibovanou produkcí NO od oplozeného vajíčka je ovlivnění vývoje MCCs, ionocytů a SSCs. Výsledky ukazují významné snížení množství buněk interkalujících do vnější epidermální vrstvy (MCCs, SSCs a ionocyty) u embryí s inhibovanou produkcí NO, zatímco „goblet“ buňky nejsou výrazně ovlivněny (Obr. 20,21,22). Pokles množství MCCs, ionocytů a SSCs ukazuje důležitost NO pro správný vývoj embryonální pokožky drápatky vodní. Navíc použití *nNOS* MO vedlo k výraznějšímu poklesu počtu specializovaných buněk v porovnání s účinkem *eNOS* MO, což naznačuje dominantní úlohu nNOS ve vývoji embryonální pokožky.

NO reguloval vývoj pouze specializovaných buněčných typů (MCCs, SSCs, ionocyty) vnitřní vrstvy epidermis, zatímco „goblet“ buňky nebyly výrazně ovlivněny. Tento rozdíl podle mě souvisí s odlišným vývojem vnitřní a vnější epidermální vrstvy, který je určen různými maternálními determinantami (jako je PAR1 nebo aPKC, které jsou asymetricky lokalizované), zajišťující polaritu buněk a kontrolující buněčný osud

vnější a vnitřní epidermální vrstvy (Chalmers *et al.*, 2003; Ossipova *et al.*, 2007). Nezbytností asymetrické lokalizace v časných embryonálních stádiích, jak na úrovni RNA, tak na proteinové úrovni, jsem se věnovala v rámci jiného projektu v Laboratoři Genové exprese, (Sindelka *et al.*, 2018).

Nedávno bylo v embryonální pokožce drápatky vodní také prokázáno spojení mezi vývojem ionocytů a MCCs – deplece ionocytů negativně ovlivnila vývoj MCCs (Dubaissi and Papalopulu, 2011). Oba tyto epidermální buněčné typy rovněž produkují NO (Obr. 17). Přestože u SSCs nebyla detekována produkce NO, tak embrya s inhibovanou produkcí NO mají výrazně redukované množství SSCs. To naznačuje úzké propojení mezi těmito bunečnými typy a podporuje teorii vzájemného ovlivňování. Zároveň je ukázána nezbytnost NO pro správný vývoj embryonální epidermis drápatky vodní.

NO ovlivňuje hlavně buněčné typy interkalující do vnější vrstvy epidermis (Obr. 20,21) a ke specifikaci těchto buněk dochází v časných stádiích embryonálního vývoje – již během gastrulace (Billett and Gould, 1971; Asada-Kubota, 1989; Deblandre *et al.*, 1999; Marnellos *et al.*, 2000; Stubbs *et al.*, 2006; Quigley *et al.*, 2011). Pro objasnění časového vlivu NO na vývoj těchto buněk, byla produkce NO během vývoje pokožky blokována chemickým inhibitorem syntáz NO (TRIM), který specificky inhibuje funkci nNOS a iNOS a s nižší účinností také eNOS (Handy *et al.*, 1996). Výsledky ukázaly, že produkce NO je nezbytná ve velmi časných vývojových stádiích, ve kterých dochází právě ke specifikaci ionocytů a MCCs. Embrya, která byla inkubována s inhibitorem TRIM od stádia gastruly, téměř zcela postrádala MCCs, zatímco inhibice produkce NO v pozdějších stádiích vývoje vedla k menšímu nebo žádnému efektu na MCCs (Obr. 30).

Podobný účinek na specializované epidermální buněčné typy byl pozorovaný působením exogenního BMP na embryonální epidermis drápatky vodní, který vedl ke zvýšené expresi *dll,* a tím ke snížení MCCs, ionocytů a SSCs přes Notch signální dráhu. Tento efekt nastal pouze v případě ovlivnění embrya před pozdní gastrulací. (Cibois *et al.*, 2015). Inhibice NO od oplozeného vajíčka ovšem vedla naopak k poklesu exprese *dll1* (Tab. 5), což ukazuje na odlišný mechanismus působení NO na embryonální epidermis drápatky vodní.

Přesto nutnost časné produkce NO během epidermálního vývoje naznačuje možnou spojitost NO s Notch signalizační kaskádou, která je dobře známá jako klíčový faktor pro vývoj embryonální pokožky (mechanismem laterální inhibice dochází ve vnitřní epidermální vrstvě k vývoji prekurzorů ionocytů a MCCs) (Deblandre *et al.*, 1999; Marnellos *et al.*, 2000; Stubbs *et al.*, 2006; Quigley *et al.*, 2011). Výsledky tuto spojitost mezi NO a Notch dráhou ukazují (Obr. 32), ovšem momentálně není možné odvodit přesný mechanismus jejich účinků. Je zajímavé, že podobným způsobem jako je tomu u embryonální epidermis drápatky vodní, reguluje Notch signalizace také diferenciaci epiteliálních plicních buněk (Tsao *et al.*, 2009; Morimoto *et al.*, 2012; Marcet *et al.*, 2011).

Mechanismus působení NO

Nejčastější působení NO v organismu je přes sGC-cGMP-PKG signalizační kaskádu, ale NO může také ovlivňovat organismus nezávisle na cGMP (Salvemini *et al.*, 1993; Bolotina *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 2010). Inhibicí sGC a PKG (pomocí chemického inhibitoru ODQ a MO proti *prkg1*) bylo prokázáno, že NO působí na vývoj embryonální pokožky zejména skrz kanonickou sGC-cGMP-PKG signalizační kaskádu (Obr. 25). PKG je známým regulátorem genové exprese, proto pravděpodobným mechanismem působení NO během embryonálního vývoje pokožky drápatky vodní je právě regulace na transkripční úrovni. Ke všemu již v minulosti bylo prokázáno, že NO může genovou expresi regulovat (Pilz *et al.*, 1995; Gudi *et al.*, 1997; Tapia-Limonchi *et al.*, 2016). Pro potvrzení této hypotézy byla připravena transkripční analýza embryí s chronicky redukovanou produkcí NO. Přestože byly srovnávány transkriptomové změny z celých embryí, mnoho genů s výrazně změněnou expresí bylo spojeno s vývojem epidermis. Byl nalezen pokles (na úrovni mRNA) u členů rodiny laminiů, keratinů, kolagenů nebo matrix metalopeptidáz, které jsou považovány za nezbytné pro správnou funkci pokožky (Tab. 4). V případě kolagenů byly změny potvrzeny i na proteinové úrovni, kdy inhibice produkce NO vedla ke ztenčení kolagenové vrstvy, což může zásadně ovlivnit funkci pokožky jako bariéry vůči vnějšímu prostředí (Obr. 28).

Kromě poklesu genové exprese u genů důležitých pro správný vývoj a fungování pokožky došlo u embryí s inhibovanou produkcí NO k obrovskému nárůstu genové exprese transkripčních faktorů *c-jun* a *c-fos* (Tab. 4). Tyto transkripční faktory tvoří protein AP-1, který má klíčovou úlohu při regulaci buněčné proliferace a diferenciace

(Angel *et al.*, 2001). Je známo, že c-Fos a c-Jun jsou exprimovány v keratinocytech a zvýšená exprese c-Jun je spojována s kožním onemocněním psoriásou či s plicním karcinomem (Szabo *et al.*, 1996; Mehic *et al.*, 2005). Změna exprese c-Jun navíc souvisí s diferenciací ciliárního epitelu vejcovodů, který je složený z MCCs a sekrečních buněk. Pro vývoj tohoto ciliárního epitelu je nezbytné snížení množství c-Jun, které je indukované ciliogenním transkripčním faktorem FoxJ1 (Okada *et al.*, 1999). V minulosti se také zjistilo, že NO (za pomocí nosiče) inhibuje nitrosylací aktivitu AP-1 a je schopný blokovat vazbu c-Jun na DNA (Tabuchi *et al.*, 1994; Klatt *et al.*, 1999). Na druhou stranu v chondrocytech indukuje NO vazbu AP-1 na DNA (Mendes *et al.*, 2002).

Je zajímavé, že u embryí s inhibovanou produkcí NO byla exprese *c-jun* a c-*fos* extrémně zvýšená (Tab. 4) a *c-jun* byl navíc roztroušeně exprimován pouze v některých epidermálních buňkách (Obr. 29). Momentálně není objasněno, o jaký epidermální typ se jedná. Pokud se ale zvýšená exprese *c-jun* nachází v MCCs, je možné předpokládat, že hladina *c-jun* (případně AP-1 proteinu) je v embryonální pokožce drápatky vodní regulována pomocí NO, podobně jako FoxJ1 reguluje množství c-Jun v ciliárním epitelu vejcovodů. Na druhou stranu u plicních epiteliálních buněk, které byly vystaveny působení NO (inkubací buněk s donorem NO: NONOat a SNAP) docházelo rovněž ke zvýšené expresi *c-fos* a *c-jun* jak na úrovni mRNA, tak na proteinové úrovni (Janssen *et al.*, 1997). Možným vysvětlením je, že jakákoliv dysregulace NO vede k zásadním změnám genové exprese, mající za následek ovlivnění vývoje a fungování mukociliárního epitelu. Navíc možná regulace aktivity AP-1 proteinu nitrosylací naznačuje, že NO by mohl ovlivňovat mukociliární epitel více způsoby než jen regulací genové exprese.

Nejvýraznější zvýšení exprese *c-jun* u embryí s inhibovanou produkcí NO bylo při kombinovaném působení *eNOS* a *nNOS* MO, ve srovnání s jejich samostatným účinkem (Obr. 29). Tyto výsledky naznačují synergický efekt eNOS a nNOS syntázy, ovšem bude nezbytná další rozsáhlá analýza pro potvrzení synergického působení těchto syntáz a vlivu NO na AP-1. Tyto výsledky také ukazují novou důležitou úlohu NO pro správný vývoj a funkci mukociliárního epitelu.

Oxid dusnatý a jeho role během procesu multiciliogeneze

U embryí s inhibovanou produkcí NO dochází kromě výrazného snížení počtu specializovaných epidermálních buněk také k zásadním fenotypovým změnám v délce a počtu cilií v rámci jedné MCCs, naznačující důležitou úlohu NO během procesu multiciliogeneze. Množství cilií MCCs u embryí s inhibovaným NO je značně redukované (Obr. 31). Důvodem může být výrázný nárůst exprese *cp110* u embryí s inhibovanou produkcí NO (Tab. 5), který potlačuje tvorbu axonemy (Lai *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2014).

Cilie jsou v MCCs tvořeny z tzv. bazálních tělísek, které jsou ukotveny v apikální aktinové síti MCCs (Werner *et al.*, 2011; Antoniades *et al.*, 2014). Inhibice NO vede v MCCs k abnormální lokalizaci bazálních tělísek, která jsou často akumulovaná apikálně ve středové oblasti (Obr. 33). To může být způsobeno strukturními změnami aktinové sítě, spolu s redukovanou expresí *actb* a *tuba1a* u embryí s inhibovanou produkcí NO (Obr. 23,33). Tvorba aktinové sítě je regulována různými faktory jako je malá GTPasa RhoA, CapZIP, r-RAS nebo Ezrin (Eyers *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2007; Chevalier *et al.*, 2015) a ukázalo se, že NO řídí expresi těchto genů (Tab. 5), čímž je také ovlivněna tvorba aktinové sítě. To má zásadní vliv na fungování ciliárního epitelu, jelikož organizace cytoskeletu je klíčovým regulátorem polarity a orientace cilií (Werner *et al.*, 2011). Orientace cilií je také určována proteinem Bbof1, který slouží k vytvoření a udržování uspořádání bazálních tělísek (Chien *et al.*, 2013). U embryí s inhibovanou produkcí NO dochází ke snížení exprese *bbof1* (Tab. 5), což spolu s dalšími výše zmíněnými faktory vede k abnormální lokalizaci bazálních tělísek. Navíc apikální akumulace NO u buněk produkujích tento radikál podporuje hypotézu, že NO může ovlivňovat polaritu MCCs a apikální uspořádní cytoskeletu těchto buněk.

Majorita bazálních tělísek během multiciliogeneze vzniká na struktuře zvané deuterosom, který je tvořený proteiny Plk4, Cep152, Sas6 a proteiny specificky se nacházejícími pouze v deuterosomu – CCDC78 a Deup-1 (Klos Dehring *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Ukázalo se, že inhibice produkce NO má za následek snížení expese *cep152* (Tab. 5), který je součástí jak centriolární, tak deuterosomální dráhy tvorby bazálních tělísek.

Klíčovým faktorem masivní tvorby bazálních tělísek je aktivace Deup-1, zprostředkovaná proteinovým komplexem Mcidas/E2F/Dp1, kdy exprese *mcidas* je závislá na expresi *gmnc* (jeden z hlavních regulátorů specifikace a diferenciace MCCs (Zhao *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015). Inhibice produkce NO v embryonální epidermis drápatky vodní vede k zásadnímu poklesu genové exprese *gmnc*, *dp1* a *e2f4*, zatímco exprese *mcidas* roste (Tab. 5). Není jasné, z jakého důvodu dochází k nárůstu exprese *mcidas*. Protein mcidas reguluje transkripční faktor Myb, který je nezbytný nejen pro tvorbu bazálních tělísek, ale ovlivňuje i další kroky multiciliogeneze (Tan *et al.*, 2013), a jeho genová exprese u embryí s inhibovanou produkcí NO klesá, stejně jako je tomu v případě *gmnc*, *dp1* a *e2f4* nebo *tp73* (Tab. 5).

Proces multiciliogeneze začíná specifikací a diferenciací MCCs z bazálních buněk mechanismem laterální inhibice, pod kontrolou Notch signalizace (Deblandre *et al.*, 1999; Marnellos *et al.*, 2000; Stubbs *et al.*, 2006; Quigley *et al.*, 2011). Přestože se ukázala souvislost mezi NO a Notch signalizací (Obr. 32), tak NO neovlivňuje expresi *notch1* v embryonální pokožce drápatky vodní (Tab. 5). Celkově se zdá, že NO může ovlivňovat multiciliogenezi na všech úrovních – během specifikace a diferenciace MCCs, namnožení bazálních tělísek, migrace a ukotvení bazálních tělísek i na úrovní polarizace.

Porovnání vlivu NO na vývoj embryonální epidermis drápatky vodní a vývoj lidského bronchiálního epitelu

Již v minulosti byla embryonální epidermis drápatky vodní využita jako vhodný model pro studium obecných mechanismů mukózních a mukociliárních epitelií a jejich defektů. Embryonální pokožka drápatky vodní je stejně jako respirační epitel složena ze sekrečních buněk, bazálních buněk a MCCs. Navíc diferenciace MCCs je podobně regulována v lidském respiračním epitelu a epidermis drápatky vodní (Marcet et al., 2011). Zároveň se v MCCs lidského plicního epitelu vyskytují NO syntázy (Jackson et al., 2015), což naznačuje možné zapojení NO rovněž při vývoji plicní tkáně.

Měření hladiny NO je běžně používáno v klinické praxi pro odhalení různých plicních onemocnění jako je primární ciliární dyskineze (PCD, neboli syndrom nepohyblivých řasinek) nebo astma, kdy PCD je charakteristická nižší hladinou vydechovaného NO, zatímco astma je typické zvýšenou hladinou vydechovaného NO (Kharitonov *et al.*, 1994; Karadag *et al.*, 1999; Leigh *et al.*, 2013).

Díky spolupráci s oddělením plicní toxikologie na Karolinské Univerzitě ve Švédsku bylo možné testování vlivu NO na vyvíjející se lidský plicní epitel. Pro experimenty byl využit zavedený model lidských primárních bronchiálních epiteliálních buněk (PBEC), u kterého byla produkce NO inhibovaná chemickým inhibitorem TRIM.

Výsledky ukázaly pokles markerových genů *cc10* (*scgb1a1*) pro Clara buňky a *α-tubulinu* spolu s *foxJ1* pro MCCs, naznačující pokles množství těchto typů buněk v respiračním epitelu v důsledku inhibice produkce NO (Obr. 35). Masivní redukce uteroglobinu (protein CC10), který je produkovaný Clara buňkami, tyto výsledky podporuje (Obr. 35). Negativní ovlivnění Clara buněk v lidském bronchiálním epitelu bylo překvapením, jelikož tyto buňky fungují jako progenitorové buňky, které mohou diferencovat jak do buněk sekrečních, tak do MCCs (Knight and Holgate, 2003; Reynolds and Malkinson, 2010). Navíc je tento buněčný typ důležitý pro regeneraci plicního epitelu (Rawlins *et al.*, 2009), což naznačuje zásadní úlohu NO během procesu regenerace v plicní tkáni.

Tyto výsledky ukazují nezbytnost NO během vývoje, případně regenerace, lidského plicního epitelu. Navíc stejně jako tomu bylo u embryonální epidermis drápatky vodní, došlo následkem inhibice produkce NO k poklesu exprese genů *myb* a *actb* a nárůstu exprese genů *fos* a *mcidas* (Obr. 35), potvrzující obecné působení NO na mukociliární epitel. Navíc snížená hladina NO je charakteristická u pacientů s PCD, u kterých dochází k funkčním a strukurním abnormalitám MCCs, což souhlasí s výsledky v této práci, kdy inhibice produkce NO vede k poklesu množství MCCs a k zásadním strukturním deformacím, majícím za následek nefunkčnost ciliárních buněk.

Celkově tyto výsledky zdůrazňují důležitost NO během formování embryonální epidermis drápatky vodní, vývoje lidské plicní tkáně a zejména zásadní vliv NO v procesu multiciliogeneze. Výsledky mohou přispět k plnému pochopení vývoje a fungování mukociliárního epitelu, což je nezbytné pro případnou léčbu defektů tohoto epitelu.

7 Shrnutí a závěr

V rámci této práce byly stanoveny cíle:

1) Identifikace produkce oxidu dusnatého (NO) v embryonální epidermis drápatky vodní

   NO je produkován v embryonální epidermis drápatky vodní dvěma specializovanými buněčnými typy – ionocyty a MCCs. K produkci NO dochází ve vnější vrstvě embryonální epidermis a NO se během vývoje akumuluje zejména v apikální oblasti těchto buněk.

2) Popis fenotypových změn u embryí se zablokovanou produkcí NO drápatky vodní

   Produkce NO byla inhibována chemickým inhibitorem TRIM nebo pomocí MO proti *eNOS* a *nNOS*. Embrya s inhibovanou produkcí NO měla redukovanou oblast hlavy, vyvíjela se pomaleji než kontrolní embrya a inhibice produkce NO vedla k poklesu množství specializovaných epidermálních typů (MCCs, SSCs a ionocytů). U MCCs navíc došlo ke strukturním defektům (méně cilií na buňku, kratší cilie).

3) Identifikace kandidátních genů, jejichž exprese je regulována NO

   Porovnáním transkriptomů mezi embryi s inhibovanou produkcí NO a kontrolními vzorky byla detekována exprese 1702, která byla regulována NO. Mezi nimi byly geny, které jsou spojeny s vývojem a funkcí pokožky, například kolageny, keratiny, lamininy nebo matrix metalopeptidázy. Navíc byly pomocí RT-qPCR u epidermálních vzorků s inhibovanou produkcí NO odhaleny geny zásadní pro multiciliogenezi.

4) Studium procesů závislých na NO

   NO reguluje velké množství genů, které se účastní různých biologických procesů. Z důvodu vlivu NO na MCCs byl pro další studium vybrán proces multiciliogeneze. U MCCs s inhibovanou produkcí NO byla odhalena abnormální lokalizace bazálních tělísek, změny aktinové sítě a změny

exprese genů nezbytných pro multiciliogenezi na všech úrovních – specifikace a diferenciace MCCs, namnožení bazálních tělísek, migrace a ukotvení bazálních tělísek (a s tím spojena tvorba axonemy) i na úrovní polarizace. Obecné působení NO na mukociliární epitel bylo potvrzeno studiem role NO během vývoje lidského bronchiálního epitelu.

Tato práce jasně ukazuje novou úlohu NO během embryonálního vývoje pokožky drápatky vodní a jeho zásadní vliv na proces multiciliogeneze, mechanismem regulace exprese genů nezbytných během tohoto procesu. Výsledky rovněž ukazují důležitost NO pro vývoj a fungování lidského plicního epitelu a jsou základem pro další výzkum NO v procesu multiciliogeneze a studium lidských mukociliárních epitelů a jejich defektů.

8 Seznam literatury

Al Jord, A., Lemaitre, A. I., Delgehyr, N., Faucourt, M., Spassky, N. & Meunier, A. 2014. Centriole Amplification by Mother and Daughter Centrioles Differs in Multiciliated Cells. *Nature,* **516,** 104-7.

Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A. & Radi, R. 1996. Peroxynitrite-Dependent Tryptophan Nitration. *Chemical Research in Toxicology,* **9,** 390-396.

Anaeigoudari, A., Soukhtanloo, M., Shafei, M. N., Sadeghnia, H. R., Reisi, P., Beheshti, F., Behradnia, S., Mousavi, S. M. & Hosseini, M. 2016. Neuronal Nitric Oxide Synthase Has a Role in the Detrimental Effects of Lipopolysaccharide on Spatial Memory and Synaptic Plasticity in Rats. *Pharmacol Rep,* **68,** 243-9.

Anders, S., McCarthy, D. J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G. K., Huber, W. & Robinson, M. D. 2013. Count-Based Differential Expression Analysis of Rna Sequencing Data Using R and Bioconductor. *Nat Protoc,* **8,** 1765-86.

Anderson, R. G. 1972. 3-Dimensional Structure of Basal Body from Rhesus-Monkey Oviduct. *Journal of Cell Biology,* **54,** 246-&.

Angel, P., Szabowski, A. & Schorpp-Kistner, M. 2001. Function and Regulation of Ap-1 Subunits in Skin Physiology and Pathology. *Oncogene,* **20,** 2413-23.

Antoniades, I., Stylianou, P., Christodoulou, N. & Skourides, P. A. 2017. Addressing the Functional Determinants of Fak During Ciliogenesis in Multiciliated Cells. *J Biol Chem,* **292,** 488-504.

Antoniades, I., Stylianou, P. & Skourides, P. A. 2014. Making the Connection: Ciliary Adhesion Complexes Anchor Basal Bodies to the Actin Cytoskeleton. *Dev Cell,* **28,** 70-80.

Arbi, M., Pefani, D. E., Kyrousi, C., Lalioti, M. E., Kalogeropoulou, A., Papanastasiou, A. D., Taraviras, S. & Lygerou, Z. 2016. Gemc1 Controls Multiciliogenesis in the Airway Epithelium. *EMBO Rep,* **17,** 400-13.

Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. & Murad, F. 1977. Nitric Oxide Activates Guanylate Cyclase and Increases Guanosine 3':5'-Cyclic Monophosphate Levels in Various Tissue Preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **74,** 3203-7.

Asada-Kubota, M. 1989. Cellular Polarity in Cultured Animal Pole Cells of Xenopus Embryos. *J Ultrastruct Mol Struct Res,* **102,** 265-75.

Bachvarova, R., Davidson, E. H., Allfrey, V. G. & Mirsky, A. E. 1966. Activation of Rna Synthesis Associated with Gastrulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **55,** 358-+.

Baldwin, F. 1994. Basal Cells in Human Bronchial Epithelium. *Anat Rec,* **238,** 360-7.

Balligand, J. L., Ungureanulongrois, D., Simmons, W. W., Pimental, D., Malinski, T. A., Kapturczak, M., Taha, Z., Lowenstein, C. J., Davidoff, A. J., Kelly, R. A., Smith, T. W. & Michel, T. 1994. Cytokine-Inducible Nitric-Oxide Synthase (Inos) Expression in Cardiac Myocytes - Characterization and Regulation of Inos Expression and Detection of Inos Activity in Single Cardiac Myocytes in-Vitro. *Journal of Biological Chemistry,* **269,** 27580-27588.

Baranano, D. E., Ferris, C. D. & Snyder, S. H. 2001. Atypical Neural Messengers. *Trends Neurosci,* **24,** 99-106.

Bayer, H., Muller, T., Myrtek, D., Sorichter, S., Ziegenhagen, M., Norgauer, J., Zissel, G. & Idzko, M. 2007. Serotoninergic Receptors on Human Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol,* **36,** 85-93.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. & Freeman, B. A. 1990. Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite - Implications for Endothelial

Injury from Nitric-Oxide and Superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **87,** 1620-1624.

Benjamin, N., O'Driscoll, F., Dougall, H., Duncan, C., Smith, L., Golden, M. & McKenzie, H. 1994. Stomach No Synthesis. *Nature,* **368,** 502.

Billett, F. S. & Gould, R. P. 1971. Fine Structural Changes in the Differentiating Epidermis of Xenopus Laevis Embryos. *J Anat,* **108,** 465-80.

Blough, N. V. & Zafiriou, O. C. 1985. Reaction of Superoxide with Nitric-Oxide to Form Peroxonitrite in Alkaline Aqueous-Solution. *Inorganic Chemistry,* **24,** 3502-3504.

Boissel, J. P., Ohly, D., Bros, M., Godtel-Armbrust, U., Forstermann, U. & Frank, S. 2004. The Neuronal Nitric Oxide Synthase Is Upregulated in Mouse Skin Repair and in Response to Epidermal Growth Factor in Human Hacat Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology,* **123,** 132-139.

Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics,* **30,** 2114-20.

Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. & Cohen, R. A. 1994. Nitric-Oxide Directly Activates Calcium-Dependent Potassium Channels in Vascular Smooth-Muscle. *Nature,* **368,** 850-853.

Boon, M., Wallmeier, J., Ma, L., Loges, N. T., Jaspers, M., Olbrich, H., Dougherty, G. W., Raidt, J., Werner, C., Amirav, I., Hevroni, A., Abitbul, R., Avital, A., Soferman, R., Wessels, M., O'Callaghan, C., Chung, E. M., Rutman, A., Hirst, R. A., Moya, E., Mitchison, H. M., Van Daele, S., De Boeck, K., Jorissen, M., Kintner, C., Cuppens, H. & Omran, H. 2014. Mcidas Mutations Result in a Mucociliary Clearance Disorder with Reduced Generation of Multiple Motile Cilia. *Nat Commun,* **5,** 4418.

Boutin, C., Labedan, P., Dimidschstein, J., Richard, F., Cremer, H., Andre, P., Yang, Y., Montcouquiol, M., Goffinet, A. M. & Tissir, F. 2014. A Dual Role for Planar Cell Polarity Genes in Ciliated Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **111,** E3129-38.

Brown, N. J., Marjanovic, M., Luders, J., Stracker, T. H. & Costanzo, V. 2013. Cep63 and Cep152 Cooperate to Ensure Centriole Duplication. *PLoS One,* **8,** e69986.

Carroll, E. J. & Hedrick, J. L. 1974. Hatching in Toad Xenopus-Laevis - Morphological Events and Evidence for a Hatching Enzyme. *Developmental Biology,* **38,** 1-13.

Cibois, M., Luxardi, G., Chevalier, B., Thome, V., Mercey, O., Zaragosi, L. E., Barbry, P., Pasini, A., Marcet, B. & Kodjabachian, L. 2015. Bmp Signalling Controls the Construction of Vertebrate Mucociliary Epithelia. *Development,* **142,** 2352-63.

Clough, G. F. 1999. Role of Nitric Oxide in the Regulation of Microvascular Perfusion in Human Skin in Vivo. *J Physiol,* **516 (Pt 2),** 549-57.

Conti, G., Rostami, A., Scarpini, E., Baron, P., Galimberti, D., Bresolin, N., Contri, M., Palumbo, C. & De Pol, A. 2004. Inducible Nitric Oxide Synthase (Inos) in Immune-Mediated Demyelination and Wallerian Degeneration of the Rat Peripheral Nervous System. *Exp Neurol,* **187,** 350-8.

Daff, S. 2010. No Synthase: Structures and Mechanisms. *Nitric Oxide,* **23,** 1-11.

Deblandre, G. A., Wettstein, D. A., Koyano-Nakagawa, N. & Kintner, C. 1999. A Two-Step Mechanism Generates the Spacing Pattern of the Ciliated Cells in the Skin of Xenopus Embryos. *Development,* **126,** 4715-28.

DeVault, K. R. & Castell, D. O. 1999. Updated Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol,* **94,** 1434-42.

Dinerman, J. L., Steiner, J. P., Dawson, T. M., Dawson, V. & Snyder, S. H. 1994. Cyclic Nucleotide Dependent Phosphorylation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibits Catalytic Activity. *Neuropharmacology,* **33,** 1245-51.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. & Gingeras, T. R. 2013. Star: Ultrafast Universal Rna-Seq Aligner. *Bioinformatics,* **29,** 15-21.

Dubaissi, E. & Papalopulu, N. 2011. Embryonic Frog Epidermis: A Model for the Study of Cell-Cell Interactions in the Development of Mucociliary Disease. *Dis Model Mech,* **4,** 179-92.

Dubaissi, E., Rousseau, K., Lea, R., Soto, X., Nardeosingh, S., Schweickert, A., Amaya, E., Thornton, D. J. & Papalopulu, N. 2014. A Secretory Cell Type Develops Alongside Multiciliated Cells, Ionocytes and Goblet Cells, and Provides a Protective, Anti-Infective Function in the Frog Embryonic Mucociliary Epidermis. *Development,* **141,** 1514-25.

Eyers, C. E., McNeill, H., Knebel, A., Morrice, N., Arthur, S. J., Cuenda, A. & Cohen, P. 2005. The Phosphorylation of Capz-Interacting Protein (Capzip) by Stress-Activated Protein Kinases Triggers Its Dissociation from Capz. *Biochem J,* **389,** 127-35.

Feistel, K. & Blum, M. 2006. Three Types of Cilia Including a Novel 9+4 Axoneme on the Notochordal Plate of the Rabbit Embryo. *Dev Dyn,* **235,** 3348-58.

Feng, Q., Song, W., Lu, X., Hamilton, J. A., Lei, M., Peng, T. & Yee, S. P. 2002. Development of Heart Failure and Congenital Septal Defects in Mice Lacking Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation,* **106,** 873-9.

Firat-Karalar, E. N. & Stearns, T. 2014. The Centriole Duplication Cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* **369**.

Fliegauf, M., Kahle, A., Haffner, K. & Zieger, B. 2014. Distinct Localization of Septin Proteins to Ciliary Sub-Compartments in Airway Epithelial Cells. *Biol Chem,* **395,** 151-6.

Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., Triebold, K. J., Pfeffer, K., Lowenstein, C. J., Schreiber, R., Mak, T. W. & Bloom, B. R. 1995. Tumor-Necrosis-Factor-Alpha Is Required in the Protective Immune-Response against Mycobacterium-Tuberculosis in Mice. *Immunity,* **2,** 561-572.

Francis, S. H., Busch, J. L. & Corbin, J. D. 2010. Cgmp-Dependent Protein Kinases and Cgmp Phosphodiesterases in Nitric Oxide and Cgmp Action. *Pharmacological Reviews,* **62,** 525-563.

Fulton, D., Babbitt, R., Zoellner, S., Fontana, J., Acevedo, L., McCabe, T. J., Iwakiri, Y. & Sessa, W. C. 2004. Targeting of Endothelial Nitric-Oxide Synthase to the Cytoplasmic Face of the Golgi Complex or Plasma Membrane Regulates Akt- Versus Calcium-Dependent Mechanisms for Nitric Oxide Release. *J Biol Chem,* **279,** 30349-57.

Fulton, D., Church, J. E., Ruan, L., Li, C., Sood, S. G., Kemp, B. E., Jennings, I. G. & Venema, R. C. 2005. Src Kinase Activates Endothelial Nitric-Oxide Synthase by Phosphorylating Tyr-83. *J Biol Chem,* **280,** 35943-52.

Funk, M. C., Bera, A. N., Menchen, T., Kuales, G., Thriene, K., Lienkamp, S. S., Dengjel, J., Omran, H., Frank, M. & Arnold, S. J. 2015. Cyclin O (Ccno) Functions During Deuterosome-Mediated Centriole Amplification of Multiciliated Cells. *EMBO J,* **34,** 1078-89.

Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. 1980. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature,* **288,** 373-6.

Galea, E., Reis, D. J. & Feinstein, D. L. 1994. Cloning and Expression of Inducible Nitric-Oxide Synthase from Rat Astrocytes. *Journal of Neuroscience Research,* **37,** 406-414.

Garcia-Gonzalo, F. R., Corbit, K. C., Sirerol-Piquer, M. S., Ramaswami, G., Otto, E. A., Noriega, T. R., Seol, A. D., Robinson, J. F., Bennett, C. L., Josifova, D. J., Garcia-Verdugo, J. M., Katsanis, N., Hildebrandt, F. & Reiter, J. F. 2011. A Transition

Zone Complex Regulates Mammalian Ciliogenesis and Ciliary Membrane Composition. *Nat Genet,* **43,** 776-84.

Garcin, E. D., Bruns, C. M., Lloyd, S. J., Hosfield, D. J., Tiso, M., Gachhui, R., Stuehr, D. J., Tainer, J. A. & Getzoff, E. D. 2004. Structural Basis for Isozyme-Specific Regulation of Electron Transfer in Nitric-Oxide Synthase. *J Biol Chem,* **279,** 37918-27.

Geller, D. A., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., Disilvio, M., Wang, S. C., Nakayama, D. K., Simmons, R. L., Snyder, S. H. & Billiar, T. R. 1993a. Molecular-Cloning and Expression of Inducible Nitric-Oxide Synthase from Human Hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **90,** 3491-3495.

Geller, D. A., Nussler, A. K., Disilvio, M., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Wang, S. C., Simmons, R. L. & Billiar, T. R. 1993b. Cytokines, Endotoxin, and Glucocorticoids Regulate the Expression of Inducible Nitric-Oxide Synthase in Hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **90,** 522-526.

Gilbert, S. F. & Barresi, M. J. F. 2016. *Developmental Biology*, Sinauer.

Giordano, A., Tonello, C., Bulbarelli, A., Cozzi, V., Cinti, S., Carruba, M. O. & Nisoli, E. 2002. Evidence for a Functional Nitric Oxide Synthase System in Brown Adipocyte Nucleus. *Febs Letters,* **514,** 135-140.

Gobeil, F., Jr., Zhu, T., Brault, S., Geha, A., Vazquez-Tello, A., Fortier, A., Barbaz, D., Checchin, D., Hou, X., Nader, M., Bkaily, G., Gratton, J. P., Heveker, N., Ribeiro-da-Silva, A., Peri, K., Bard, H., Chorvatova, A., D'Orleans-Juste, P., Goetzl, E. J. & Chemtob, S. 2006. Nitric Oxide Signaling Via Nuclearized Endothelial Nitric-Oxide Synthase Modulates Expression of the Immediate Early Genes Inos and Mpges-1. *J Biol Chem,* **281,** 16058-67.

Gomperts, B. N., Gong-Cooper, X. & Hackett, B. P. 2004. Foxj1 Regulates Basal Body Anchoring to the Cytoskeleton of Ciliated Pulmonary Epithelial Cells. *Journal of Cell Science,* **117,** 1329-1337.

Gonzalez-Hernandez, T. & Rustioni, A. 1999. Expression of Three Forms of Nitric Oxide Synthase in Peripheral Nerve Regeneration. *J Neurosci Res,* **55,** 198-207.

Goodenough, U. W. & Heuser, J. E. 1982. Substructure of the Outer Dynein Arm. *J Cell Biol,* **95,** 798-815.

Gordon, R. E. 1982. 3-Dimensional Organization of Microtubules and Microfilaments of the Basal Body Apparatus of Ciliated Respiratory Epithelium. *Cell Motility and the Cytoskeleton,* **2,** 385-391.

Gouge, R. C., Marshburn, P., Gordon, B. E., Nunley, W. & Huet-Hudson, Y. M. 1998. Nitric Oxide as a Regulator of Embryonic Development. *Biol Reprod,* **58,** 875-9.

Gray, R. S., Abitua, P. B., Wlodarczyk, B. J., Szabo-Rogers, H. L., Blanchard, O., Lee, I., Weiss, G. S., Liu, K. J., Marcotte, E. M., Wallingford, J. B. & Finnell, R. H. 2009. The Planar Cell Polarity Effector Fuz Is Essential for Targeted Membrane Trafficking, Ciliogenesis and Mouse Embryonic Development. *Nat Cell Biol,* **11,** 1225-32.

Grisanti, L., Revenkova, E., Gordon, R. E. & Iomini, C. 2016. Primary Cilia Maintain Corneal Epithelial Homeostasis by Regulation of the Notch Signaling Pathway. *Development,* **143,** 2160-2171.

Gudi, T., Lohmann, S. M. & Pilz, R. B. 1997. Regulation of Gene Expression by Cyclic Gmp-Dependent Protein Kinase Requires Nuclear Translocation of the Kinase: Identification of a Nuclear Localization Signal. *Mol Cell Biol,* **17,** 5244-54.

Guirao, B., Meunier, A., Mortaud, S., Aguilar, A., Corsi, J. M., Strehl, L., Hirota, Y., Desoeuvre, A., Boutin, C., Han, Y. G., Mirzadeh, Z., Cremer, H., Montcouquiol,

M., Sawamoto, K. & Spassky, N. 2010. Coupling between Hydrodynamic Forces and Planar Cell Polarity Orients Mammalian Motile Cilia. *Nat Cell Biol,* **12,** 341-50.

Gurdon, J. B. 1962. The Developmental Capacity of Nuclei Taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *J Embryol Exp Morphol,* **10,** 622-40.

Gurdon, J. B., Elsdale, T. R. & Fischberg, M. 1958. Sexually Mature Individuals of Xenopus Laevis from the Transplantation of Single Somatic Nuclei. *Nature,* **182,** 64-5.

Gurdon, J. B. & Hopwood, N. 2000. The Introduction of Xenopus Laevis into Developmental Biology: Of Empire, Pregnancy Testing and Ribosomal Genes. *Int J Dev Biol,* **44,** 43-50.

Habedanck, R., Stierhof, Y. D., Wilkinson, C. J. & Nigg, E. A. 2005. The Polo Kinase Plk4 Functions in Centriole Duplication. *Nature Cell Biology,* **7,** 1140-1146.

Hakim, T. S., Sugimori, K., Camporesi, E. M. & Anderson, G. 1996. Half-Life of Nitric Oxide in Aqueous Solutions with and without Haemoglobin. *Physiological Measurement,* **17,** 267-277.

Han, S. J., Jang, H. S., Kim, J. I., Lipschutz, J. H. & Park, K. M. 2016. Unilateral Nephrectomy Elongates Primary Cilia in the Remaining Kidney Via Reactive Oxygen Species. *Sci Rep,* **6,** 22281.

Handy, R. L., Harb, H. L., Wallace, P., Gaffen, Z., Whitehead, K. J. & Moore, P. K. 1996. Inhibition of Nitric Oxide Synthase by 1-(2-Trifluoromethylphenyl) Imidazole (Trim) in Vitro: Antinociceptive and Cardiovascular Effects. *Br J Pharmacol,* **119,** 423-31.

Harland, R. M. & Grainger, R. M. 2011. Xenopus Research: Metamorphosed by Genetics and Genomics. *Trends Genet,* **27,** 507-15.

Hayes, J. M., Kim, S. K., Abitua, P. B., Park, T. J., Herrington, E. R., Kitayama, A., Grow, M. W., Ueno, N. & Wallingford, J. B. 2007. Identification of Novel Ciliogenesis Factors Using a New in Vivo Model for Mucociliary Epithelial Development. *Dev Biol,* **312,** 115-30.

Hecker, M., Mulsch, A. & Busse, R. 1994. Subcellular Localization and Characterization of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *J Neurochem,* **62,** 1524-9.

Hessel, J., Heldrich, J., Fuller, J., Staudt, M. R., Radisch, S., Hollmann, C., Harvey, B. G., Kaner, R. J., Salit, J., Yee-Levin, J., Sridhar, S., Pillai, S., Hilton, H., Wolff, G., Bitter, H., Visvanathan, S., Fine, J., Stevenson, C. S., Crystal, R. G. & Tilley, A. E. 2014. Intraflagellar Transport Gene Expression Associated with Short Cilia in Smoking and Copd. *PLoS One,* **9,** e85453.

Hevel, J. M., White, K. A. & Marletta, M. A. 1991. Purification of the Inducible Murine Macrophage Nitric Oxide Synthase. Identification as a Flavoprotein. *J Biol Chem,* **266,** 22789-91.

Hood, J. & Granger, H. J. 1998. Protein Kinase G Mediates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Raf-1 Activation and Proliferation in Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry,* **273,** 23504-23508.

Houston, D. W. 2013. Regulation of Cell Polarity and Rna Localization in Vertebrate Oocytes. *Int Rev Cell Mol Biol,* **306,** 127-85.

Hovenberg, H. W., Davies, J. R. & Carlstedt, I. 1996. Different Mucins Are Produced by the Surface Epithelium and the Submucosa in Human Trachea: Identification of Muc5ac as a Major Mucin from the Goblet Cells. *Biochem J,* **318 (Pt 1),** 319-24.

Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M. P., Nachury, M. V., Spiliotis, E. T. & Nelson, W. J. 2010. A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium Maintains Ciliary Membrane Protein Distribution. *Science,* **329,** 436-9.

Huang, P. L., Dawson, T. M., Bredt, D. S., Snyder, S. H. & Fishman, M. C. 1993. Targeted Disruption of the Neuronal Nitric-Oxide Synthase Gene. *Cell,* **75,** 1273-1286.

Huang, P. L., Huang, Z. H., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A. & Fishman, M. C. 1995. Hypertension in Mice Lacking the Gene for Endothelial Nitric-Oxide Synthase. *Nature,* **377,** 239-242.

Chalmers, A. D., Strauss, B. & Papalopulu, N. 2003. Oriented Cell Divisions Asymmetrically Segregate Apkc and Generate Cell Fate Diversity in the Early Xenopus Embryo. *Development,* **130,** 2657-68.

Chang, C. & Hemmati-Brivanlou, A. 1998. Cell Fate Determination in Embryonic Ectoderm. *J Neurobiol,* **36,** 128-51.

Chen, D. & Zhong, Y. 2015. A Computational Model of Dynein Activation Patterns That Can Explain Nodal Cilia Rotation. *Biophys J,* **109,** 35-48.

Chevalier, B., Adamiok, A., Mercey, O., Revinski, D. R., Zaragosi, L. E., Pasini, A., Kodjabachian, L., Barbry, P. & Marcet, B. 2015. Mir-34/449 Control Apical Actin Network Formation During Multiciliogenesis through Small Gtpase Pathways. *Nat Commun,* **6,** 8386.

Chien, Y. H., Werner, M. E., Stubbs, J., Joens, M. S., Li, J., Chien, S., Fitzpatrick, J. A., Mitchell, B. J. & Kintner, C. 2013. Bbof1 Is Required to Maintain Cilia Orientation. *Development,* **140,** 3468-77.

Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. & Wood, K. S. 1987. Endothelium-Derived Relaxing Factor from Pulmonary Artery and Vein Possesses Pharmacologic and Chemical Properties Identical to Those of Nitric Oxide Radical. *Circ Res,* **61,** 866-79.

Ikeyama, K., Denda, S., Tsutsumi, M. & Denda, M. 2010. Neuronal Nitric Oxide Synthase in Epidermis Is Involved in Cutaneous Circulatory Response to Mechanical Stimulation. *J Invest Dermatol,* **130,** 1158-66.

Ischiropoulos, H. 1998. Biological Tyrosine Nitration: A Pathophysiological Function of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* **356,** 1-11.

Jackson, C. L., Lucas, J. S., Walker, W. T., Owen, H., Premadeva, I. & Lackie, P. M. 2015. Neuronal Nos Localises to Human Airway Cilia. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry,* **44,** 3-7.

Jacox, L., Sindelka, R., Chen, J., Rothman, A., Dickinson, A. & Sive, H. 2014. The Extreme Anterior Domain Is an Essential Craniofacial Organizer Acting through Kinin-Kallikrein Signaling. *Cell Rep,* **8,** 596-609.

Janssen, Y. M., Matalon, S. & Mossman, B. T. 1997. Differential Induction of C-Fos, C-Jun, and Apoptosis in Lung Epithelial Cells Exposed to Ros or Rns. *Am J Physiol,* **273,** L789-96.

Jiao, J., Han, D., Meng, N., Jin, S. & Zhang, L. 2010. Regulation of Tracheal Ciliary Beat Frequency by Nitric Oxide Synthase Substrate L-Arginine. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec,* **72,** 6-11.

Karadag, B., James, A. J., Gultekin, E., Wilson, N. M. & Bush, A. 1999. Nasal and Lower Airway Level of Nitric Oxide in Children with Primary Ciliary Dyskinesia. *Eur Respir J,* **13,** 1402-5.

Keller, R. E. 1980. The Cellular Basis of Epiboly - an Sem Study of Deep-Cell Rearrangement During Gastrulation in Xenopus-Laevis. *Journal of Embryology and Experimental Morphology,* **60,** 201-234.

Kellogg, D. L., Jr., Zhao, J. L., Coey, U. & Green, J. V. 2005. Acetylcholine-Induced Vasodilation Is Mediated by Nitric Oxide and Prostaglandins in Human Skin. *J Appl Physiol (1985),* **98,** 629-32.

Kharitonov, S. A., Yates, D., Robbins, R. A., Logan-Sinclair, R., Shinebourne, E. A. & Barnes, P. J. 1994. Increased Nitric Oxide in Exhaled Air of Asthmatic Patients. *Lancet,* **343,** 133-5.

Kim, S. K., Shindo, A., Park, T. J., Oh, E. C., Ghosh, S., Gray, R. S., Lewis, R. A., Johnson, C. A., Attie-Bittach, T., Katsanis, N. & Wallingford, J. B. 2010. Planar Cell Polarity Acts through Septins to Control Collective Cell Movement and Ciliogenesis. *Science,* **329,** 1337-40.

Klatt, P., Molina, E. P. & Lamas, S. 1999. Nitric Oxide Inhibits C-Jun DNA Binding by Specifically Targeted S-Glutathionylation. *J Biol Chem,* **274,** 15857-64.

Kleinert, H., Wallerath, T., Fritz, G., Ihrig-Biedert, I., Rodriguez-Pascual, F., Geller, D. A. & Forstermann, U. 1998. Cytokine Induction of No Synthase Ii in Human Dld-1 Cells: Roles of the Jak-Stat, Ap-1 and Nf-Kappa B-Signaling Pathways. *British Journal of Pharmacology,* **125,** 193-201.

Klos Dehring, D. A., Vladar, E. K., Werner, M. E., Mitchell, J. W., Hwang, P. & Mitchell, B. J. 2013. Deuterosome-Mediated Centriole Biogenesis. *Dev Cell,* **27,** 103-12.

Knight, D. A. & Holgate, S. T. 2003. The Airway Epithelium: Structural and Functional Properties in Health and Disease. *Respirology,* **8,** 432-46.

Knowles, R. G. & Moncada, S. 1994. Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochem J,* **298 (Pt 2),** 249-58.

Komeima, K., Hayashi, Y., Naito, Y. & Watanabe, Y. 2000. Inhibition of Neuronal Nitric-Oxide Synthase by Calcium/ Calmodulin-Dependent Protein Kinase Iialpha through Ser847 Phosphorylation in Ng108-15 Neuronal Cells. *J Biol Chem,* **275,** 28139-43.

Kopylova, E., Noe, L. & Touzet, H. 2012. Sortmerna: Fast and Accurate Filtering of Ribosomal Rnas in Metatranscriptomic Data. *Bioinformatics,* **28,** 3211-7.

Korzhevskii, D. E., Otellin, V. A., Grigor'ev, I. P., Petrova, E. S., Gilerovich, E. G. & Zin'kova, N. N. 2008. Immunocytochemical Detection of Neuronal No Synthase in Rat Brain Cells. *Neurosci Behav Physiol,* **38,** 835-8.

Kuriyama, R. & Borisy, G. G. 1981. Centriole Cycle in Chinese-Hamster Ovary Cells as Determined by Whole-Mount Electron-Microscopy. *Journal of Cell Biology,* **91,** 814-821.

Kuzin, B., Roberts, I., Peunova, N. & Enikolopov, G. 1996. Nitric Oxide Regulates Cell Proliferation During Drosophila Development. *Cell,* **87,** 639-49.

Kyrousi, C., Arbi, M., Pilz, G. A., Pefani, D. E., Lalioti, M. E., Ninkovic, J., Gotz, M., Lygerou, Z. & Taraviras, S. 2015. Mcidas and Gemc1 Are Key Regulators for the Generation of Multiciliated Ependymal Cells in the Adult Neurogenic Niche. *Development,* **142,** 3661-74.

Lai, Y., Chen, B., Shi, J., Palmer, J. N., Kennedy, D. W. & Cohen, N. A. 2011. Inflammation-Mediated Upregulation of Centrosomal Protein 110, a Negative Modulator of Ciliogenesis, in Patients with Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol,* **128,** 1207-1215 e1.

Lee, M. Y., Gamez-Mendez, A., Zhang, J., Zhuang, Z., Vinyard, D. J., Kraehling, J., Velazquez, H., Brudvig, G. W., Kyriakides, T. R., Simons, M. & Sessa, W. C. 2018. Endothelial Cell Autonomous Role of Akt1: Regulation of Vascular Tone and Ischemia-Induced Arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* **38,** 870-879.

Leigh, M. W., Hazucha, M. J., Chawla, K. K., Baker, B. R., Shapiro, A. J., Brown, D. E., Lavange, L. M., Horton, B. J., Qaqish, B., Carson, J. L., Davis, S. D., Dell, S. D., Ferkol, T. W., Atkinson, J. J., Olivier, K. N., Sagel, S. D., Rosenfeld, M., Milla, C., Lee, H. S., Krischer, J., Zariwala, M. A. & Knowles, M. R. 2013. Standardizing Nasal Nitric Oxide Measurement as a Test for Primary Ciliary Dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc,* **10,** 574-81.

Li, D., Shirakami, G., Zhan, X. & Johns, R. A. 2000. Regulation of Ciliary Beat Frequency by the Nitric Oxide-Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling Pathway in Rat Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol,* **23,** 175-81.

Lin, H. Y., Wu, C. L. & Huang, C. C. 2010. The Akt-Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway in Lipopolysaccharide Preconditioning-Induced Hypoxic-Ischemic Tolerance in the Neonatal Rat Brain. *Stroke,* **41,** 1543-51.

Linares, D., Taconis, M., Mana, P., Correcha, M., Fordham, S., Staykova, M. & Willenborg, D. O. 2006. Neuronal Nitric Oxide Synthase Plays a Key Role in Cns Demyelination. *J Neurosci,* **26,** 12672-81.

Lincoln, T. M., Dey, N. B., Boerth, N. J., Cornwell, T. L. & Soff, G. A. 1998. Nitric Oxide--Cyclic Gmp Pathway Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Modulation: Implications in Vascular Diseases. *Acta Physiol Scand,* **164,** 507-15.

Lombardo, M. C., Graziano, M., Polacco, J. C. & Lamattina, L. 2006. Nitric Oxide Functions as a Positive Regulator of Root Hair Development. *Plant Signal Behav,* **1,** 28-33.

Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. 2014. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for Rna-Seq Data with Deseq2. *Genome Biol,* **15,** 550.

Loweth, A. C., Williams, G. T., Scarpello, J. H. B. & Morgan, N. G. 1997. Evidence for the Involvement of Cgmp and Protein Kinase G in Nitric Oxide-Induced Apoptosis in the Pancreatic B-Cell Line, Hit-T15. *Febs Letters,* **400,** 285-288.

Ma, L., Quigley, I., Omran, H. & Kintner, C. 2014. Multicilin Drives Centriole Biogenesis Via E2f Proteins. *Genes Dev,* **28,** 1461-71.

Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L. E., Cibois, M., Robbe-Sermesant, K., Jolly, T., Cardinaud, B., Moreilhon, C., Giovannini-Chami, L., Nawrocki-Raby, B., Birembaut, P., Waldmann, R., Kodjabachian, L. & Barbry, P. 2011. Control of Vertebrate Multiciliogenesis by Mir-449 through Direct Repression of the Delta/Notch Pathway (Vol 13, Pg 693, 2011). *Nature Cell Biology,* **13,** 1280-1280.

Marnellos, G., Deblandre, G. A., Mjolsness, E. & Kintner, C. 2000. Delta-Notch Lateral Inhibitory Patterning in the Emergence of Ciliated Cells in Xenopus: Experimental Observations and a Gene Network Model. *Pac Symp Biocomput***,** 329-40.

Marshall, C. B., Mays, D. J., Beeler, J. S., Rosenbluth, J. M., Boyd, K. L., Santos Guasch, G. L., Shaver, T. M., Tang, L. J., Liu, Q., Shyr, Y., Venters, B. J., Magnuson, M. A. & Pietenpol, J. A. 2016. P73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell Rep,* **14,** 2289-300.

Martin, E., Nathan, C. & Xie, Q. W. 1994. Role of Interferon Regulatory Factor-1 in Induction of Nitric-Oxide Synthase. *Journal of Experimental Medicine,* **180,** 977-984.

Mayer, B., John, M. & Bohme, E. 1990. Purification of a Ca2+/Calmodulin-Dependent Nitric Oxide Synthase from Porcine Cerebellum. Cofactor-Role of Tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett,* **277,** 215-9.

Mehic, D., Bakiri, L., Ghannadan, M., Wagner, E. F. & Tschachler, E. 2005. Fos and Jun Proteins Are Specifically Expressed During Differentiation of Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol,* **124,** 212-20.

Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W. & Varesio, L. 1995. A Hypoxia-Responsive Element Mediates a Novel Pathway of Activation of the Inducible Nitric-Oxide Synthase Promoter. *Journal of Experimental Medicine,* **182,** 1683-1693.

Mendes, A. F., Carvalho, A. P., Caramona, M. M. & Lopes, M. C. 2002. Role of Nitric Oxide in the Activation of Nf-Kappab, Ap-1 and Nos Ii Expression in Articular Chondrocytes. *Inflamm Res,* **51,** 369-75.

Mendes, D. A. G. B., Horinouchi, C. D. D., Prudente, A. D., Soley, B. D., Assreuy, J., Otuki, M. F. & Cabrini, D. A. 2012. In Vivo Participation of Nitric Oxide in Hyperproliferative Epidermal Phenomena in Mice. *European Journal of Pharmacology,* **687,** 1-8.

Meunier, A. & Azimzadeh, J. 2016. Multiciliated Cells in Animals. *Cold Spring Harb Perspect Biol,* **8**.

Minshall, R. D., Sessa, W. C., Stan, R. V., Anderson, R. G. W. & Malik, A. B. 2003. Caveolin Regulation of Endothelial Function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology,* **285,** L1179-L1183.

Mitchell, B., Jacobs, R., Li, J., Chien, S. & Kintner, C. 2007. A Positive Feedback Mechanism Governs the Polarity and Motion of Motile Cilia. *Nature,* **447,** 97-101.

Mitchell, B., Stubbs, J. L., Huisman, F., Taborek, P., Yu, C. & Kintner, C. 2009. The Pcp Pathway Instructs the Planar Orientation of Ciliated Cells in the Xenopus Larval Skin. *Curr Biol,* **19,** 924-9.

Miyamoto, T., Petrus, M. J., Dubin, A. E. & Patapoutian, A. 2011. Trpv3 Regulates Nitric Oxide Synthase-Independent Nitric Oxide Synthesis in the Skin. *Nat Commun,* **2,** 369.

Miyatake, K., Kusakabe, M., Takahashi, C. & Nishida, E. 2015. Erk7 Regulates Ciliogenesis by Phosphorylating the Actin Regulator Capzip in Cooperation with Dishevelled. *Nat Commun,* **6,** 6666.

Morimoto, M., Nishinakamura, R., Saga, Y. & Kopan, R. 2012. Different Assemblies of Notch Receptors Coordinate the Distribution of the Major Bronchial Clara, Ciliated and Neuroendocrine Cells. *Development,* **139,** 4365-73.

Motley, E. D., Eguchi, K., Patterson, M. M., Palmer, P. D., Suzuki, H. & Eguchi, S. 2007. Mechanism of Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation and Activation by Thrombin. *Hypertension,* **49,** 577-83.

Myklebust, R., Engedal, H., Saetersdal, T. S. & Ulstein, M. 1977. Primary 9 + 0 Cilia in the Embryonic and the Adult Human Heart. *Anat Embryol (Berl),* **151,** 127-39.

Nagata, S. 2005. Isolation, Characterization, and Extra-Embryonic Secretion of the Xenopus Laevis Embryonic Epidermal Lectin, Xeel. *Glycobiology,* **15,** 281-90.

Nagata, S., Nakanishi, M., Nanba, R. & Fujita, N. 2003. Developmental Expression of Xeel, a Novel Molecule of the Xenopus Oocyte Cortical Granule Lectin Family. *Development Genes and Evolution,* **213,** 368-370.

Nakane, M., Mitchell, J., Forstermann, U. & Murad, F. 1991. Phosphorylation by Calcium Calmodulin-Dependent Protein Kinase Ii and Protein Kinase C Modulates the Activity of Nitric Oxide Synthase. *Biochem Biophys Res Commun,* **180,** 1396-402.

Nedeianu, S., Pali, T. & Marsh, D. 2004. Membrane Penetration of Nitric Oxide and Its Donor S-Nitroso-N-Acetylpenicillamine: A Spin-Label Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopic Study. *Biochim Biophys Acta,* **1661,** 135-43.

Newport, J. & Kirschner, M. 1982. A Major Developmental Transition in Early Xenopus Embryos: I. Characterization and Timing of Cellular Changes at the Midblastula Stage. *Cell,* **30,** 675-86.

Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. 1994. *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin)*, Garland Publishing Inc, New York.

Nishikawa, S., Hirata, J. & Sasaki, F. 1992. Fate of Ciliated Epidermal Cells During Early Development of Xenopus Laevis Using Whole-Mount Immunostaining with an Antibody against Chondroitin 6-Sulfate Proteoglycan and Anti-Tubulin: Transdifferentiation or Metaplasia of Amphibian Epidermis. *Histochemistry,* **98,** 355-8.

Nishikawa, S. & Sasaki, F. 1993. Secretion of Chondroitin Sulfate from Embryonic Epidermal Cells in Xenopus Laevis. *J Histochem Cytochem,* **41,** 1373-81.

Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y. & Hamada, H. 2002. Determination of Left-Right Patterning of the Mouse Embryo by Artificial Nodal Flow. *Nature,* **418,** 96-9.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. & Hirokawa, N. 1998. Randomization of Left-Right Asymmetry Due to Loss of Nodal

Cilia Generating Leftward Flow of Extraembryonic Fluid in Mice Lacking Kif3b Motor Protein. *Cell,* **95,** 829-37.

O'Donnell, V. B., Eiserich, J. P., Chumley, P. H., Jablonsky, M. J., Krishna, N. R., Kirk, M., Barnes, S., Darley-Usmar, V. M. & Freeman, B. A. 1999. Nitration of Unsaturated Fatty Acids by Nitric Oxide-Derived Reactive Nitrogen Species Peroxynitrite, Nitrous Acid, Nitrogen Dioxide, and Nitronium Ion. *Chemical Research in Toxicology,* **12,** 83-92.

Odate, T., Takeda, S., Narita, K. & Kawahara, T. 2016. 9 + 0 and 9 + 2 Cilia Are Randomly Dispersed in the Mouse Node. *Microscopy (Oxf),* **65,** 119-26.

Odor, D. L. & Blandau, R. J. 1985. Observations on the Solitary Cilium of Rabbit Oviductal Epithelium - Its Motility and Ultrastructure. *American Journal of Anatomy,* **174,** 437-453.

Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H. & Hirokawa, N. 1999. Abnormal Nodal Flow Precedes Situs Inversus in Iv and Inv Mice. *Mol Cell,* **4,** 459-68.

Ossipova, O., Chu, C. W., Fillatre, J., Brott, B. K., Itoh, K. & Sokol, S. Y. 2015. The Involvement of Pcp Proteins in Radial Cell Intercalations During Xenopus Embryonic Development. *Dev Biol*.

Ossipova, O., Tabler, J., Green, J. B. & Sokol, S. Y. 2007. Par1 Specifies Ciliated Cells in Vertebrate Ectoderm Downstream of Apkc. *Development,* **134,** 4297-306.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. 1987. Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature,* **327,** 524-6.

Pan, J. H., You, Y. J., Huang, T. & Brody, S. L. 2007. Rhoa-Mediated Apical Actin Enrichment Is Required for Ciliogenesis and Promoted by Foxj1. *Journal of Cell Science,* **120,** 1868-1876.

Park, T. J., Haigo, S. L. & Wallingford, J. B. 2006. Ciliogenesis Defects in Embryos Lacking Inturned or Fuzzy Function Are Associated with Failure of Planar Cell Polarity and Hedgehog Signaling. *Nat Genet,* **38,** 303-11.

Park, T. J., Kim, S. K. & Wallingford, J. B. 2015. The Planar Cell Polarity Effector Protein Wdpcp (Fritz) Controls Epithelial Cell Cortex Dynamics Via Septins and Actomyosin. *Biochem Biophys Res Commun,* **456,** 562-6.

Park, T. J., Mitchell, B. J., Abitua, P. B., Kintner, C. & Wallingford, J. B. 2008. Dishevelled Controls Apical Docking and Planar Polarization of Basal Bodies in Ciliated Epithelial Cells. *Nat Genet,* **40,** 871-9.

Peunova, N., Scheinker, V., Ravi, K. & Enikolopov, G. 2007. Nitric Oxide Coordinates Cell Proliferation and Cell Movements During Early Development of Xenopus. *Cell Cycle,* **6,** 3132-44.

Pilz, R. B., Suhasini, M., Idriss, S., Meinkoth, J. L. & Boss, G. R. 1995. Nitric Oxide and Cgmp Analogs Activate Transcription from Ap-1-Responsive Promoters in Mammalian Cells. *FASEB J,* **9,** 552-8.

Quigley, I. K., Stubbs, J. L. & Kintner, C. 2011. Specification of Ion Transport Cells in the Xenopus Larval Skin. *Development,* **138,** 705-14.

Rawlins, E. L., Okubo, T., Xue, Y., Brass, D. M., Auten, R. L., Hasegawa, H., Wang, F. & Hogan, B. L. 2009. The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell,* **4,** 525-34.

Renn, J., Pruvot, B. & Muller, M. 2014. Detection of Nitric Oxide by Diaminofluorescein Visualizes the Skeleton in Living Zebrafish. *Journal of applied ichthyology,* **30,** 701-706.

Reynolds, S. D. & Malkinson, A. M. 2010. Clara Cell: Progenitor for the Bronchiolar Epithelium. *Int J Biochem Cell Biol,* **42,** 1-4.

Riefler, G. M. & Firestein, B. L. 2001. Binding of Neuronal Nitric-Oxide Synthase (Nnos) to Carboxyl-Terminal-Binding Protein (Ctbp) Changes the Localization of Ctbp from the Nucleus to the Cytosol: A Novel Function for Targeting by the Pdz Domain of Nnos. *J Biol Chem,* **276,** 48262-8.

Rock, J. R., Onaitis, M. W., Rawlins, E. L., Lu, Y., Clark, C. P., Xue, Y., Randell, S. H. & Hogan, B. L. 2009. Basal Cells as Stem Cells of the Mouse Trachea and Human Airway Epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **106,** 12771-5.

Rossman, C. M., Lee, R. M., Forrest, J. B. & Newhouse, M. T. 1984. Nasal Ciliary Ultrastructure and Function in Patients with Primary Ciliary Dyskinesia Compared with That in Normal Subjects and in Subjects with Various Respiratory Diseases. *Am Rev Respir Dis,* **129,** 161-7.

Roth, K. E., Rieder, C. L. & Bowser, S. S. 1988. Flexible-Substratum Technique for Viewing Cells from the Side: Some in Vivo Properties of Primary (9+0) Cilia in Cultured Kidney Epithelia. *J Cell Sci,* **89 (Pt 4),** 457-66.

Sachs, G., Shin, J. M., Vagin, O., Lambrecht, N., Yakubov, I. & Munson, K. 2007. The Gastric H,K Atpase as a Drug Target: Past, Present, and Future. *J Clin Gastroenterol,* **41 Suppl 2,** S226-42.

Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. & Needleman, P. 1993. Nitric-Oxide Activates Cyclooxygenase Enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **90,** 7240-7244.

Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Marionneau, C., Loirand, G. & Pacaud, P. 2003. Rhoa Expression Is Controlled by Nitric Oxide through Cgmp-Dependent Protein Kinase Activation. *J Biol Chem,* **278,** 9472-80.

Sengoku, K., Takuma, N., Horikawa, M., Tsuchiya, K., Komori, H., Sharifa, D., Tamate, K. & Ishikawa, M. 2001. Requirement of Nitric Oxide for Murine Oocyte Maturation, Embryo Development, and Trophoblast Outgrowth in Vitro. *Mol Reprod Dev,* **58,** 262-8.

Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A. & Pamer, E. G. 2003. Tnf/Inos-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity,* **19,** 59-70.

Schaffer, M. R., Tantry, U., Gross, S. S., Wasserburg, H. L. & Barbul, A. 1996. Nitric Oxide Regulates Wound Healing. *J Surg Res,* **63,** 237-40.

Schamberger, A. C., Staab-Weijnitz, C. A., Mise-Racek, N. & Eickelberg, O. 2015. Cigarette Smoke Alters Primary Human Bronchial Epithelial Cell Differentiation at the Air-Liquid Interface. *Sci Rep,* **5,** 8163.

Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Nakane, M., Forstermann, U. & Murad, F. 1992. Ca2+/Calmodulin-Regulated Nitric Oxide Synthases. *Cell Calcium,* **13,** 427-34.

Sidova, M., Sindelka, R., Castoldi, M., Benes, V. & Kubista, M. 2015a. Intracellular Microrna Profiles Form in the Xenopus Laevis Oocyte That May Contribute to Asymmetric Cell Division. *Sci Rep,* **5,** 11157.

Sidova, M., Tomankova, S., Abaffy, P., Kubista, M. & Sindelka, R. 2015b. Effects of Post-Mortem and Physical Degradation on Rna Integrity and Quality. *Biomol Detect Quantif,* **5,** 3-9.

Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Kronig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O. A., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T. & Walz, G. 2005. Inversin, the Gene Product Mutated in Nephronophthisis Type Ii, Functions as a Molecular Switch between Wnt Signaling Pathways. *Nat Genet,* **37,** 537-43.

Sindelka, R., Abaffy, P., Qu, Y. Y., Tomankova, S., Sidova, M., Naraine, R., Kolar, M., Peuchen, E., Sun, L. L., Dovichi, N. & Kubista, M. 2018. Asymmetric Distribution

of Biomolecules of Maternal Origin in the Xenopus Laevis Egg and Their Impact on the Developmental Plan. *Scientific Reports,* **8**.

Sindelka, R., Sidova, M., Svec, D. & Kubista, M. 2010. Spatial Expression Profiles in the Xenopus Laevis Oocytes Measured with Qpcr Tomography. *Methods,* **51,** 87-91.

Sive, H. L., Grainger, R. M. & Harland, R. M. 2000. *Early Development of Xenopus Laevis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Skirkanich, J., Luxardi, G., Yang, J., Kodjabachian, L. & Klein, P. S. 2011. An Essential Role for Transcription before the Mbt in Xenopus Laevis. *Dev Biol,* **357,** 478-91.

Song, R., Walentek, P., Sponer, N., Klimke, A., Lee, J. S., Dixon, G., Harland, R., Wan, Y., Lishko, P., Lize, M., Kessel, M. & He, L. 2014. Mir-34/449 Mirnas Are Required for Motile Ciliogenesis by Repressing Cp110. *Nature,* **510,** 115-20.

Sorokin, S. P. 1968. Reconstructions of Centriole Formation and Ciliogenesis in Mammalian Lungs. *Journal of Cell Science,* **3,** 207-&.

Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N., Pfeilschifter, J. & Frank, S. 1999. The Function of Nitric Oxide in Wound Repair: Inhibition of Inducible Nitric Oxide-Synthase Severely Impairs Wound Reepithelialization. *J Invest Dermatol,* **113,** 1090-8.

Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J. & Loscalzo, J. 1992. S-Nitrosylation of Proteins with Nitric-Oxide - Synthesis and Characterization of Biologically-Active Compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **89,** 444-448.

Steinman, R. M. 1968. An Electron Microscopic Study of Ciliogenesis in Developing Epidermis and Trachea in Embryo of Xenopus Laevis. *American Journal of Anatomy,* **122,** 19-&.

Stolz, D. B., Zamora, R., Vodovotz, Y., Loughran, P. A., Billiar, T. R., Kim, Y. M., Simmons, R. L. & Watkins, S. C. 2002. Peroxisomal Localization of Inducible Nitric Oxide Synthase in Hepatocytes. *Hepatology,* **36,** 81-93.

Stubbs, J. L., Davidson, L., Keller, R. & Kintner, C. 2006. Radial Intercalation of Ciliated Cells During Xenopus Skin Development. *Development,* **133,** 2507-15.

Stubbs, J. L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J. C. & Kintner, C. 2008. The Forkhead Protein Foxj1 Specifies Node-Like Cilia in Xenopus and Zebrafish Embryos. *Nat Genet,* **40,** 1454-60.

Stubbs, J. L., Vladar, E. K., Axelrod, J. D. & Kintner, C. 2012. Multicilin Promotes Centriole Assembly and Ciliogenesis During Multiciliate Cell Differentiation. *Nat Cell Biol,* **14,** 140-7.

Stuehr, D. J., Kwon, N. S., Nathan, C. F., Griffith, O. W., Feldman, P. L. & Wiseman, J. 1991. N Omega-Hydroxy-L-Arginine Is an Intermediate in the Biosynthesis of Nitric Oxide from L-Arginine. *J Biol Chem,* **266,** 6259-63.

Subczynski, W. K., Lomnicka, M. & Hyde, J. S. 1996. Permeability of Nitric Oxide through Lipid Bilayer Membranes. *Free Radic Res,* **24,** 343-9.

Sulik, K., Dehart, D. B., Iangaki, T., Carson, J. L., Vrablic, T., Gesteland, K. & Schoenwolf, G. C. 1994. Morphogenesis of the Murine Node and Notochordal Plate. *Dev Dyn,* **201,** 260-78.

Szabo, E., Riffe, M. E., Steinberg, S. M., Birrer, M. J. & Linnoila, R. I. 1996. Altered Cjun Expression: An Early Event in Human Lung Carcinogenesis. *Cancer Res,* **56,** 305-15.

Tabuchi, A., Sano, K., Oh, E., Tsuchiya, T. & Tsuda, M. 1994. Modulation of Ap-1 Activity by Nitric Oxide (No) in Vitro: No-Mediated Modulation of Ap-1. *FEBS Lett,* **351,** 123-7.

Tan, F. E., Vladar, E. K., Ma, L., Fuentealba, L. C., Hoh, R., Espinoza, F. H., Axelrod, J. D., Alvarez-Buylla, A., Stearns, T., Kintner, C. & Krasnow, M. A. 2013. Myb

Promotes Centriole Amplification and Later Steps of the Multiciliogenesis Program. *Development,* **140,** 4277-86.

Tapia-Limonchi, R., Cahuana, G. M., Caballano-Infantes, E., Salguero-Aranda, C., Beltran-Povea, A., Hitos, A. B., Hmadcha, A., Martin, F., Soria, B., Bedoya, F. J. & Tejedo, J. R. 2016. Nitric Oxide Prevents Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation through Regulation of Gene Expression, Cell Signaling, and Control of Cell Proliferation. *J Cell Biochem,* **117,** 2078-88.

Taylor, B. S., de Vera, M. E., Ganster, R. W., Wang, Q., Shapiro, R. A., Morris, S. M., Billiar, T. R. & Geller, D. A. 1998. Multiple Nf-Kappa B Enhancer Elements Regulate Cytokine Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *Journal of Biological Chemistry,* **273,** 15148-15156.

Teichert, A. M., Miller, T. L., Tai, S. C., Wang, Y., Bei, X., Robb, G. B., Phillips, M. J. & Marsden, P. A. 2000. In Vivo Expression Profile of an Endothelial Nitric Oxide Synthase Promoter-Reporter Transgene. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology,* **278,** H1352-H1361.

Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P. & Lancaster, J. R., Jr. 2001. The Biological Lifetime of Nitric Oxide: Implications for the Perivascular Dynamics of No and O2. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **98,** 355-60.

Thum, T., Fraccarollo, D., Schultheiss, M., Froese, S., Galuppo, P., Widder, J. D., Tsikas, D., Ertl, G. & Bauersachs, J. 2007. Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling Impairs Endothelial Progenitor Cell Mobilization and Function in Diabetes. *Diabetes,* **56,** 666-74.

Tojo, A., Gross, S. S., Zhang, L., Tisher, C. C., Schmidt, H. H. H. W., Madsen, K. M. & Wilcox, C. S. 1994. Immunocytochemical Localization of Distinct Isoforms of Nitric-Oxide Synthase in the Juxtaglomerular Apparatus of Normal Rat-Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology,* **4,** 1438-1447.

Tomankova, S., Abaffy, P. & Sindelka, R. 2017. The Role of Nitric Oxide During Embryonic Epidermis Development of Xenopus Laevis. *Biol Open,* **6,** 862-871.

Toni, M., De Angelis, F., di Patti, M. C. & Cioni, C. 2015. Nitric Oxide Synthase in the Central Nervous System and Peripheral Organs of Stramonita Haemastoma: Protein Distribution and Gene Expression in Response to Thermal Stress. *Mar Drugs,* **13,** 6636-64.

Tran, J., Magenau, A., Rodriguez, M., Rentero, C., Royo, T., Enrich, C., Thomas, S. R., Grewal, T. & Gaus, K. 2016. Activation of Endothelial Nitric Oxide (Enos) Occurs through Different Membrane Domains in Endothelial Cells. *PLoS One,* **11,** e0151556.

Tsao, P. N., Vasconcelos, M., Izvolsky, K. I., Qian, J., Lu, J. & Cardoso, W. V. 2009. Notch Signaling Controls the Balance of Ciliated and Secretory Cell Fates in Developing Airways. *Development,* **136,** 2297-307.

Van Lommel, A. 2001. Pulmonary Neuroendocrine Cells (Pnec) and Neuroepithelial Bodies (Neb): Chemoreceptors and Regulators of Lung Development. *Paediatr Respir Rev,* **2,** 171-6.

Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S., Karoui, H., Tordo, P. & Pritchard, K. A., Jr. 1998. Superoxide Generation by Endothelial Nitric Oxide Synthase: The Influence of Cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **95,** 9220-5.

Vetrovsky, P., Stoclet, J. C. & Entlicher, G. 1996. Possible Mechanism of Nitric Oxide Production from N(G)-Hydroxy-L-Arginine or Hydroxylamine by Superoxide Ion. *Int J Biochem Cell Biol,* **28,** 1311-8.

Vladar, E. K., Bayly, R. D., Sangoram, A. M., Scott, M. P. & Axelrod, J. D. 2012. Microtubules Enable the Planar Cell Polarity of Airway Cilia. *Curr Biol,* **22,** 2203-12.

Vladar, E. K., Nayak, J. V., Milla, C. E. & Axelrod, J. D. 2016. Airway Epithelial Homeostasis and Planar Cell Polarity Signaling Depend on Multiciliated Cell Differentiation. *JCI Insight,* **1**.

Vyas-Read, S., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S. & Willis, B. C. 2007. Nitric Oxide Attenuates Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,* **293,** L212-21.

Walentek, P., Beyer, T., Hagenlocher, C., Muller, C., Feistel, K., Schweickert, A., Harland, R. M. & Blum, M. 2015. Atp4a Is Required for Development and Function of the Xenopus Mucociliary Epidermis - a Potential Model to Study Proton Pump Inhibitor-Associated Pneumonia. *Dev Biol,* **408,** 292-304.

Walentek, P., Bogusch, S., Thumberger, T., Vick, P., Dubaissi, E., Beyer, T., Blum, M. & Schweickert, A. 2014. A Novel Serotonin-Secreting Cell Type Regulates Ciliary Motility in the Mucociliary Epidermis of Xenopus Tadpoles. *Development,* **141,** 1526-33.

Wallmeier, J., Al-Mutairi, D. A., Chen, C. T., Loges, N. T., Pennekamp, P., Menchen, T., Ma, L., Shamseldin, H. E., Olbrich, H., Dougherty, G. W., Werner, C., Alsabah, B. H., Kohler, G., Jaspers, M., Boon, M., Griese, M., Schmitt-Grohe, S., Zimmermann, T., Koerner-Rettberg, C., Horak, E., Kintner, C., Alkuraya, F. S. & Omran, H. 2014. Mutations in Ccno Result in Congenital Mucociliary Clearance Disorder with Reduced Generation of Multiple Motile Cilia. *Nat Genet,* **46,** 646-51.

Wallmeier, J., Shiratori, H., Dougherty, G. W., Edelbusch, C., Hjeij, R., Loges, N. T., Menchen, T., Olbrich, H., Pennekamp, P., Raidt, J., Werner, C., Minegishi, K., Shinohara, K., Asai, Y., Takaoka, K., Lee, C., Griese, M., Memari, Y., Durbin, R., Kolb-Kokocinski, A., Sauer, S., Wallingford, J. B., Hamada, H. & Omran, H. 2016. Ttc25 Deficiency Results in Defects of the Outer Dynein Arm Docking Machinery and Primary Ciliary Dyskinesia with Left-Right Body Asymmetry Randomization. *Am J Hum Genet,* **99,** 460-9.

Wang, J., Rousseau, D. L., Abu-Soud, H. M. & Stuehr, D. J. 1994. Heme Coordination of No in No Synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **91,** 10512-6.

Wangkanont, K., Wesener, D. A., Vidani, J. A., Kiessling, L. L. & Forest, K. T. 2016. Structures of Xenopus Embryonic Epidermal Lectin Reveal a Conserved Mechanism of Microbial Glycan Recognition. *J Biol Chem,* **291,** 5596-610.

Werner, M. E., Hwang, P., Huisman, F., Taborek, P., Yu, C. C. & Mitchell, B. J. 2011. Actin and Microtubules Drive Differential Aspects of Planar Cell Polarity in Multiciliated Cells. *J Cell Biol,* **195,** 19-26.

Werner, M. E. & Mitchell, B. J. 2012. Understanding Ciliated Epithelia: The Power of Xenopus. *Genesis,* **50,** 176-85.

White, K. A. & Marletta, M. A. 1992. Nitric Oxide Synthase Is a Cytochrome P-450 Type Hemoprotein. *Biochemistry,* **31,** 6627-31.

Wood, J. & Garthwaite, J. 1994. Models of the Diffusional Spread of Nitric Oxide: Implications for Neural Nitric Oxide Signalling and Its Pharmacological Properties. *Neuropharmacology,* **33,** 1235-44.

Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A. H., Troso, T. & Nathan, C. 1992. Cloning and Characterization of Inducible Nitric-Oxide Synthase from Mouse Macrophages. *Science,* **256,** 225-228.

You, Y. J., Huang, T., Richer, E. J., Schmidt, J. E. H., Zabner, J., Borok, Z. & Brody, S. L. 2004. Role of F-Box Factor Foxj1 in Differentiation of Ciliated Airway Epithelial Cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology,* **286,** L650-L657.

Zhao, H., Zhu, L., Zhu, Y., Cao, J., Li, S., Huang, Q., Xu, T., Huang, X., Yan, X. & Zhu, X. 2013. The Cep63 Paralogue Deup1 Enables Massive De Novo Centriole Biogenesis for Vertebrate Multiciliogenesis. *Nat Cell Biol,* **15,** 1434-44.

Zhou, F., Narasimhan, V., Shboul, M., Chong, Y. L., Reversade, B. & Roy, S. 2015. Gmnc Is a Master Regulator of the Multiciliated Cell Differentiation Program. *Curr Biol,* **25,** 3267-73.

Zhu, H., Wei, X., Bian, K. & Murad, F. 2008. Effects of Nitric Oxide on Skin Burn Wound Healing. *J Burn Care Res,* **29,** 804-14.

Internetové zdroje:

http://www.xenbase.org

http://www.xenbase.org/anatomy/intro.do