

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Nad'a Pravcová

Hematopoéza v rybím modelu dánia a medaky s možností xenotransplantace lidských hematopoetických kmenových buněk

Hematopoiesis in the models of zebrafish and medaka as a recipient for human HSC xenograft

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha 2020

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, 7. 6. 2020

Nad'a Pravcová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a čas, které mi během psaní mé bakalářské práce věnoval.

Abstrakt

Danio rerio (Dánio pruhované) a *Oryzias latipes* (Medaka japonská) jsou modelové organismy, jejichž popularita v oblasti studia hematopoézy v posledních letech stoupá. Důvodem jsou výhodné vlastnosti těchto modelů v porovnání s dalšími často používanými modely, především v porovnání s nejvíce používaným modelovým organismem *Mus musculus* (Myš domácí). Těmito výhodami jsou: krátká generační doba, velký počet potomků, možnost častého vytírání, vnější oplodnění a vývoj, průsvitnost embryí, snadná genetická manipulace na pozadí mnoha mutantních a transgenních linií, (především u dánie) a inbredních linií (u medaky).

Mechanismy hematopoézy jsou z velké části konzervované mezi vyššími obratlovci a dániem i medakou. Jednou z nejdůležitějších vlastností je průsvitnost embryí a existence průsvitných mutantních linií dospělců. To umožňuje sledování hematopoetických kmenových buněk („hematopoietic stem cells“, HSC) *in vivo*. Vytvořením humanizovaných modelů xenotransplantací HSC můžeme sledovat přijetí, dělení a chování lidských HSC *in vivo*. V současnosti je nejpoužívanějším organismem pro xenotransplantaci lidských HSC myš. V myších modelech je ovšem nutná imunodeplece. Jedná se o invazivní proces zahrnující ozáření nebo genetické manipulace. U dánie a medaky je možné využít časového okna, ve kterém ještě nedošlo k nástupu funkce adaptivní imunity (u dánie 4-6 týdnů po oplodnění) a vyhnout se tak imunodepleci.

Klíčová slova: dánio, medaka, hematopoéza, hematopoetická kmenová buňka (HSC), xenotransplantace, xenoreaktivita, imunitní odpověď, sc RNA sekvenace, cytometrie, mikroskopie, chimérismus, neonatální tolerance

Abstract

Danio rerio (zebrafish) and *Oryzias latipes* (medaka) have recently become popular model organisms to study hematopoiesis. These model organisms present several advantages in comparison to other commonly used models, the most common being *Mus musculus* (mouse). The advantages are shorter generation time, large offspring production, frequent spawning, external fertilization and development, the optical transparency of embryos amenable to genetic manipulation on the background of vast numbers of transgenic lines (mainly in zebrafish) and inbred strains (in medaka).

Moreover, most of the mechanisms behind zebrafish and medaka hematopoiesis are conserved in higher vertebrates. Most importantly, the optical transparency in early development and in adult mutant transparent strains allows for observation of hematopoietic stem cell (HSC) development *in vivo*. Therefore, it is possible to generate humanized fish using xenotransplanted human HSCs for studies of the engraftment, differentiation, and trafficking of human HSC *in vivo*. Currently, the most popular organism for human HSC xenotransplantation is mice. This model system is not suitable for *in vivo* imaging of HSC engraftment. Moreover, a prior immunodepletion step is necessary. The process of immunodepletion includes genetic manipulation or irradiation of mice. On the contrary, a common strategy in danio and medaka is an early transplantation process happening before the onset of adaptive immunity. Full immune competency proceeds around 4-6 weeks post fertilization (danio) avoiding the need for immunodepletion.

Keywords: danio, medaka, hematopoiesis, hematopoietic stem cells (HSC), xenotransplantation, xenograft, xenoreactivity, immune response, scRNAseq, cytometry, microscopy, chimerism, neonatal tolerance

Seznam zkratek

AGM	aorta, gonads, mesonephros	aorta, gonády, mezonefros
ALM	anterior lateral mesoderm	anteriorní laterální mezoderm
CHEST	caudal hematopoietic embryonic stromal tissue	kaudální hematopoetická embryonální stromální tkáň
CHT	caudal hematopoietic tissue	ocasní hematopoetická tkáň
CV	caudal vein	ocasní žíla
DA	dorsal aorta	dorzální aorta
dpf	day post fertilization	den po fertilizaci
dpi	day post injection	den po injekci
EC	endothelial cells	endotelové buňky
EMP	erythromyeloid precursor	erytromyeoloidní prekurzor
GVHD	graf-versus-host disease	reakce štěpu proti hostiteli
hpf	hour post fertilization	hodina po fertilizaci
hpi	hour post injection	hodina po injekci
HSC	hematopoietic stem cell	hematopoetická kmenová buňka
ICM	intermediate cell mass	intermediální buněčná masa
IS	immune system	imunitní systém
LPS	lipopolysaccharide	lipopolysacharid
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní systém
PLM	posterior lateral mesoderm	posteriovní laterální mezoderm
scRNAseq	single-cell RNA sequencing	RNA sekvenování
TLR	toll-like receptor	toll-like receptor
UCB	umbilical cord blood	pupečnicková krev
WKM	whole kidney marrow	dřeň ledvin
wpf	week post fertilization	týden po fertilizaci
ZKS	zebrafish kidney stromal cell	stromální ledvinové buňky dánia

Osnova

1. Úvod	1
1.1. Dánio a medaka jako modelové organismy	1
1.2. Embryogeneze a organogeneze	1
1.3. HSC a hematopoéza	2
1.4. Transplantace a xenotransplantace HSC	3
2. Embryogeneze dánia a medaky	4
2.1. Mikroskopie	6
2.2. scRNAseq	6
3. Hematopoéza v rybím modelu	9
3.1. Primitivní vlna	10
3.2. Definitivní vlna	10
3.3. Rozdíly hematopoézy mezi dáním a medakou	13
3.4. Hematopoéza v dospělci	13
3.4.1. Lokalizace HSC	14
4. Funkční rozdíly IS ryb oproti savcům	15
4.1. Indukce tolerance v rybách při xenotransplantacích	17
5. Transgenní – mutantní – inbrední modely	18
6. Transplantace krevních buněk	20
6.1. Alogenní transplantace HSC u ryb	20
6.2. Rybí model jako příjemce lidských hematopoetických buněk	22
7. Závěr	24
8. Seznam použité literatury	27

1. Úvod

1.1. Dánio a medaka jako modelové organismy

Dánio pruhované (*Danio rerio*), dále jen dánio, náleží do čeledi kaprovitých (*Cyprinidae*), nadřádu kostnatí (*Teleostei*) a třídy paprskoploutví (*Actinopterygii*). Medaka japonská (*Oryzias latipes*), dále jen medaka, náleží do čeledi medakovití (*Adrianichthyidae*) a nadřádu kostnatých. K oddělení nadřádu kostnatých došlo od evoluční linie savců asi před 450 miliony lety [1]. Před 320-350 miliony lety došlo u kostnatých k celogenomové duplikaci [2]. Důsledkem toho je, že dánia a medaky mohou mít dva ortology jediného savčího genu [3]. (Ortology jsou geny různých druhů organismů, které pocházejí z jednoho původního genu. Hvězdičkou jsou označeny geny, pro které nebyl nalezen ortologní savčí gen) Dánia a medaky se od sebe v evolučním vývoji oddělili před 150 miliony lety [4].

Dánio se stalo modelovým organismem v 70. letech minulého století díky úsilí skupiny vědců, mezi kterými byli Sydney Brenner, George Streisinger a Christiane Nüsslein-Volhard. Bylo vybráno jako jednoduchý mnohobuněčný organismus potenciálně vhodný pro aplikaci poznatků o transkripci a syntéze proteinů z *Escherichia coli*. Dalším důvodem byla možnost aplikace genetických metod s cílem pochopit diferenciaci buněčných linií, neurální funkce a chování modelového organismu [1].

Medaka se stala modelovým organismem v polovině 19. století díky práci Phillipa Franze von Siebold. V Japonsku byli již v předmoderní době známí barevní mutanti, kteří byli vyšlechtěni a udržováni domácími chovateli. Díky tomu měla medaka dobré předpoklady být vhodným organismem pro genetické studie. Dále sloužila k toxikologickým studiím a v současnosti byla vybraná jako modelový organismus pro projekt zkoumání fenotypové variability grantem ERC. Jednou z hlavních výhod medaky je její rezistence vůči inbrední depresi (snižování životaschopnosti potomků vzniklých křížením příbuzných jedinců). Tato vlastnost umožnila zavedení mnoha inbredních linií [5].

1.2. Embryogeneze a organogeneze

Embryogeneze je časný proces vývoje embrya, během kterého jediná totipotentní buňka schopná diferencovat se do všech buněčných typů včetně extra-embryonálních obalů vytvoří postupným dělením a diferenciací celý organismus, jeho zárodečné listy a orgány [6, 7].

Základním dějem embryogeneze je gastrulace, tedy proces vzniku zárodečných listů, během kterého dochází gastrulačními pohyby k přeskupování buněk embrya a vzniku

zárodečných listů. U dána sledujeme nejprve vznik ektodermu a mesendodermu. Mesendoderm se později rozděluje na endoderm a mezoderm. Z mesendodermu vznikají hematopoetické buňky a primární hematopoetická tkáň dospělců, včetně ledvin [7, 8].

První snahy o popis a klasifikaci embryogeneze byly založené na mikroskopických pozorováních. Na základě takto získaných dat byla embryogeneze rozdělena na časově-závislé fáze, a to konkrétně stádia zygoty, rýhování, blastuly, gastruly, segmentace a farynguly u dána [6], respektive u medaky [9].

Embryogeneze je řízená změnami genové exprese. Tu můžeme detailně sledovat na úrovni jednotlivých buněk při použití technik, jako jsou cytometrie a RNA sekvenování („single-cell RNA sequencing“, scRNAseq). Metoda scRNAseq kvantifikuje genovou expresi dané buňky v momentu měření. Přesto, že se zde ztrácí informace o lokalizaci buňky v embryu, jsme schopni sestavit mapu buněk a jejich vztahů na základě jejich expresního profilu. Tento přístup nám umožňuje sledovat diferenciaci a vývoj jednotlivých buněk, jak to bylo provedené právě i na modelu dána [7, 8, 10]. Metoda scRNAseq byla označena časopisem Science jako průlom roku 2018 [11].

1.3. HSC a hematopoéza

Hematopoéza je proces vzniku krevních buněk. Probíhá od časného embryonálního vývoje až do smrti organismu [12].

HSC jsou schopné diferenciaci do všech buněčných linií krve. Zajišťují tedy neustálou obnovu celého imunitního systému („immune system“, IS), trombocytů (krevních destiček) a erytrocytů [13]. U savců i ryb sídlí HSC v nikách primární hematopoetické tkáně. Tyto niky jsou tvořené stromálními buňkami, které aktivně vytvářejí prostředí schopné udržet HSC v jejich pluripotentním stavu [12, 14, 15].

U člověka tvoří hematopoetické buňky asi 93 % buněk těla. Pouze erytrocyty tvoří přibližně 84 % počtu všech buněk, které jsou ovšem bez buněčného jádra. Trombocyty pak tvoří zhruba 5 %, vznikají rozpadem megakaryocytů a stejně jako erytrocyty postrádají buněčné jádro. Leukocyty pak tvoří 4 % všech buněk lidského těla, tedy téměř 40 % všech jaderných buněk [16]. Život jednotlivých krevních buněk je různě časově omezený a musí tedy docházet k jejich neustálému nahrazování. V lidském organismu dochází ke kompletní obnově erytrocytů každé 4 měsíce, krevních destiček po 10 dnech, eozinofilů po 2-5 dnech a neutrofilů dokonce po 1-5 dnech [17].

Hematopoéza se odlišuje v různých vývojových stádiích, například u embrya a dospělého. Jak v savcích, tak i v rybách probíhá produkce embryonálních hematopoetických

buněk ve dvou vlnách: primitivní a definitivní. Primitivní vlna u savců probíhá ve žloutkovém vaku [18]. V rybách probíhá primitivní vlna ve funkčním analogu žloutkového vaku savců, v intermediální buněčné mase („intermediate cell mass“, ICM) [19]. Primitivní vlna se odehrává v raném embryonálním vývoji (dánio 10 hodin po fertilizaci („hour post fertilization“, hpf) [7, 20], medaka 34 hpf [21]) a slouží především k okysličování buněk rychle se zvětšujícího embrya a k tvorbě makrofágů pro obranu embrya vůči patogenům [18, 22].

Definitivní vlna hematopoézy se také skládá ze dvou částí. V první vznikají hematopoetické progenitory nazývané erytromyeloidní prekurzory („erythromyeloid precursor“, EMP), a to kvůli jejich omezené schopnosti diferencovat pouze na myeloidní a erytroidní buňky. V druhé vlně vznikají HSC [18]. U savců i u ryb vznikají tyto buňky v oblasti zvané aorta, gonády a mezonefros („aorta, gonads, mesonephros“, AGM). Toto označení pochází ze savců, kde aorta, gonády a mezonefros tvoří hranici této oblasti [19]. U ryb je ekvivalentem AGM prostor mezi ocasní žílou („caudal vein“, CV) a dorzální aortou („dorsal aorta“, DA), po vzoru savců se tato oblast také nazývá AGM (viz. obrázek č. 3) [23].

EMP a HSC následně migrují do fetálních jater u savců a do ocasní hematopoetické tkáně („caudal hematopoietic tissue“, CHT) u ryb. Primární hematopoetické tkáně dospělců ryb jsou ledviny a brzlík, zatímco u savců se jedná o kostní dřev a brzlík. Z CHT ryb migrují HSC ledvin [23–25] a T buňky migrují do brzlíku [23, 26]. V průběhu dospělosti organismů sídlí HSC v ledvinách a dochází k jejich neustálému dělení a tvoření všech hematopoetických buněk organismu [12].

1.4. Transplantace a xenotransplantace HSC

Transplantace krve i pevných orgánů jsou především terapeutickým řešením při poškození či selhání orgánů. Již tradičním testem HSC je schopnost obnovení hematopoézy po transplantaci do ozářeného nebo jinak imunokompromitovaného (plně imunodeficitního nebo částečně depletovaného) příjemce. Pokud by nebyla hematopoéza příjemce zachráněna přihojením (anglicky „engraftment“) HSC dárce, došlo by ke smrti příjemce. HSC jsou tedy definované svou schopností obnovit krevní systém příjemce a tím i ochranu a homeostázu organismu [27, 28].

Kromě transplantací do imunokompromitovaných jedinců se provádějí také takzvané kompetitivní testy. V nich se testuje schopnost HSC obsadit hematopoetickou niku za současné přítomnosti původních hematopoetických buněk daného jedince. Poté dochází k nastolení chimérického stavu, kdy jedinec bude mít dvě sady hematopoetických buněk – vlastní a transplantovanou [29, 30].

Úspěšná transplantace je charakterizovaná přihojením dárcova orgánu, respektive přihojením štěpu (z anglického „graft“) příjemcem („host“). Odmítnutí transplantovaného orgánu („graft rejection“) je způsobeno aktivitou IS příjemce [31]. Hlavními hráči v odmítnutí transplantovaných tkání jsou T a NK buňky. T buňky rozpoznávají antigenní peptidy prezentované na povrchu glykoproteinů hlavního histokompatibilního systému („major histocompatibility complex“, MHC) a NK buňky rozpoznávají přítomnost/nepřítomnost MHC I receptorů cizích i vlastních buněk [32, 33].

Co se týče transplantací HSC, musí docházet k pečlivému vybírání dárců s co největší podobností MHC glykoproteinů, protože možným negativním následkem může být reakce štěpu proti hostiteli („graft-versus-host disease“, GVHD). GVHD je způsobená NK a T buňkami z transplantátu dárce, které rozeznávají buňky příjemce jako cizí [31, 32]. Možným zdrojem lidských HSC buněk je kostní dřev, pupečnicková a mobilizovaná periferní krev. V klinické praxi jsou transplantace HSC využívány především při terapii leukemických pacientů, kteří před transplantací musí projít radioterapií či chemoterapií [31].

Transplantace mezi geneticky rozdílnými jedinci stejného druhu je označována jako alotransplantace. Transplantace mezi jinými druhy organismů se nazývá xenotransplantace [31]. Dánio je využíváno jako model pro alotransplantace buněk jiného organismu dánia i xenotransplantace lidských buněk. Je vhodné jak pro krátkodobé transplantace do larválních stádií, která zatím nemají kompetentní adaptivní imunitu [28, 34, 35], tak i pro dlouhodobé transplantace do dospělých jedinců [36]. V takovém případě však musí před transplantací být indukované imunosupresivní podmínky, nebo se musí využít mutantní modely s poškozenou hematopoézou [28, 37].

Cílem této práce je popsat embryogenezi dánia a medaky, především z pohledu scRNAseq, podrobný popis hematopoézy dánia a medaky, srovnání IS dánia a medaky s důrazem na rozdíly a společné znaky s IS vyšších obratlovců a shrnutí poznatků o provedených xenotransplantačních experimentech lidských HSC.

2. Embryogeneze dánia a medaky

Embrya dánia a medaky mají odlišnou rychlost vývoje. V tabulce č. 1 je uvedené srovnání časových intervalů jednotlivých stádií vývoje pro tyto dva modelové organismy.

Stádium	Dánio	Medaka
Zygota	0- $\frac{3}{4}$ h	0-1 h
Rýhování	$\frac{3}{4}$ -2 $\frac{1}{4}$ h	1-6,5 h
Blastula	2 $\frac{1}{4}$ -5 $\frac{1}{4}$ h	6,5-13 h
Gastrula	5 $\frac{1}{4}$ -10 h	13 h-1 d 3,5 h
Segmentace	10-24 h	1 d 3,5 h-4 d 10 h
Faryngula	24-48 h	4 d 10 h-9 d
Líhnutí	48-72 h	9 d
Dospělec	2 měsíce	2 měsíce

Tabulka č.1. Vývojová stádia embryogeneze dánia a medaky [6, 9, 38]

Základními procesy embryogeneze jsou epibolie, výše popsaná gastrulace dávající vznik zárodečným listům a segmentace. Epibolie je proces začínající ve stádiu blastuly, kdy se buňky začínají rozprostírat po povrchu žloutkového vaku, aby jej nakonec celý obklopily. Tento proces trvá i ve stádiu gastrulace. V stádiu segmentace dochází ke vzniku somitů, které slouží jako určující znak při mikroskopickém sledování pro určení stádia embrya [6].

Období embryogeneze dánia je ukončeno 3 dny po fertilizaci („day post fertilization“, dpf) [6] a u medaky 9 dpf [9]. Tato data odpovídají vývoji dánia v teplotě 28,5°C [39] a vývoji medaky v teplotě 26°C [9]. Jedná se o ideální teploty pro tyto modelové organismy [4, 6]. To se značně odlišuje od ideální teploty pro lidské buňky 37°C, což je potenciálním problémem pro xenotransplantace lidských buněk do těchto modelů. Teplota, ve které jsou dánia a medaky běžně chovány však může být zvýšena [39].

Teploty přirozených nalezišť dánia se pohybují od 12 do 39°C [40] a teplota inkubace embryí dánia může být zvýšená na 34 až 36°C, aniž by se zvedla úmrtnost embryí [39]. Embrya medaky jsou v laboratorních podmínkách schopná přežít rozmezí teplot 4-40°C [41] cit. dle [4].

Po ukončení embryogeneze se dánia a medaky dostávají do larvální fáze, která trvá do dosažení dospělosti. Za dosažení dospělosti je u těchto modelů považována pohlavní vyspělost. Dánia a medaky, které jsou chované ve 28°C, dosahují dospělosti ve dvou měsících [38]. Dánia se v ideálních podmínkách dožívají 2-3 let [1]. Medaka se v běžných laboratorních podmínkách dožívá 12-18 měsíců [5], ale může se dožít i více než dvou let [4].

2.1. Mikroskopie

Vývoj dánia je velice dobře zmapován. Existuje mnoho online zdrojů a databází shrnujících vývoj dánia z pohledu mikroskopických pozorování. Např. databáze Univerzity Heidelberg [digitální embryo](#) obsahující videa vyvíjejících se embryí dánia získaná pomocí „light sheet“ mikroskopie [42]. Informace o expresi genů dánia jsou k dispozici na stránkách [ZFIN](#).

2.2. scRNAseq

Transkripční profily jednotlivých buněk se nejčastěji definují pomocí již zmíněné scRNAseq metody. Výsledkem je charakterizace jednotlivých buněk na základě jejich genové exprese.

Jednou metodou používanou pro vytvoření projekce dat je tzv. „redukce dimenzionality“. Pomocí automatické analýzy jsou data pomocí různých programů uspořádána do (nejčastěji) dvoudimenzionálních map, kde se buňky s podobnou expresí nacházejí blízko u sebe. S mírou odlišnosti jejich transkripčního profilu roste pak i vzdálenost buněk v rámci této 2D projekce dat. Jedná se o uspořádání buněk za současné redukce dimenzí, kdy původní počet dimenzí odpovídá počtu analyzovaných transkriptů. Tyto mapy tak nezaujatě, tj. bez nebezpečí subjektivity hodnotitele, zobrazují vzájemnou podobnost transkripčních profilů buněk.

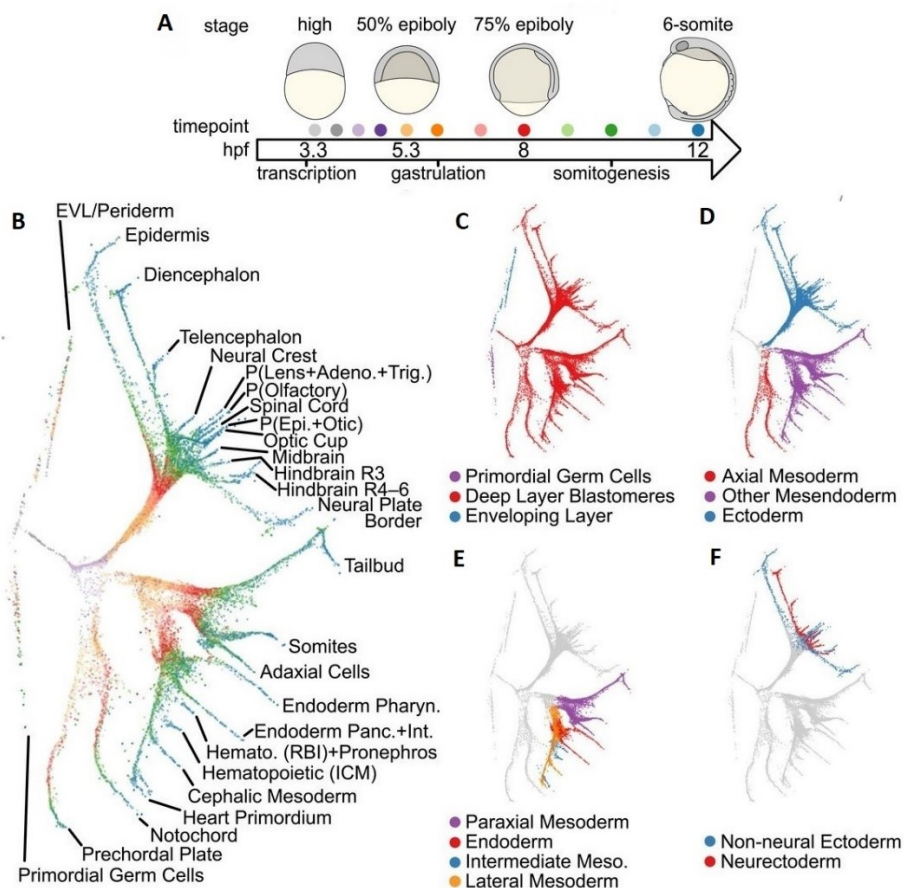
Další metodou je tzv. „inference trajektorií“. Tato metoda umožňuje sestavit buňky do mapy znázorňující jejich diferenciaci v čase. Jednotlivým buňkám je přiřazen jejich pseudočas, který znázorňuje postup buněk v procesu diferenciaci [43] Metoda inference trajektorií byla použita v následujících dvou studiích.

Farrell a kolegové sledovali embrya dánia od 3,3 hpf, tedy od stádia blastuly, kdy prvně dochází k zahájení transkripce, až do 12 hpf, do stádia segmentace. Ve 12 časových bodech mezi 3,3 až 12 hpf byly odebírány buňky embryí dánia a analyzovány pomocí scRNAseq. Celkový počet analyzovaných buněk ze všech časových bodů činil 38 731. Na základě těchto dat byla sestavena projekce ukazující kontinuální vývoj a specifikaci embryonálních buněk dánia pomocí algoritmu URD [7].

Ještě před začátkem sledování došlo k rozdělení buněk na buňky primordiální, buňky obklopující vrstvy a blastomery. Blastomery se kolem 4 hpf specifikují na axiální mezoderm, ektoderm a mesendoderm. Mezi 5,3 a 8 hpf se mesendoderm dále specifikuje na intermediální mezoderm (ze kterého vzniknou hematopoetické buňky), endoderm, paraxiální mezoderm a laterální mezoderm. Ektoderm se kolem 10 hpf dále dělí na neuroektoderm a ne-neurální ektoderm. Farrell specifikoval 25 buněčných linií u 12 hpf starých dánií. Mezi nimi byly

rozlišené hematopoetické linie na dvě distinktivní linie, ty představují primární a definitivní buněčné linie [7]. Tato data jsou shrnuta v obrázku č. 1.

Zatímco embryonální hematopoetická linie je dle Farrellových dat definovaná expresí *gata2a* (mj. je také exprimován v ektodermu) definitivní hematopoetická linie je definována expresí *wnt8a* (mj. také exprimován v laterálním a paraxiálním mezodermu) [7].

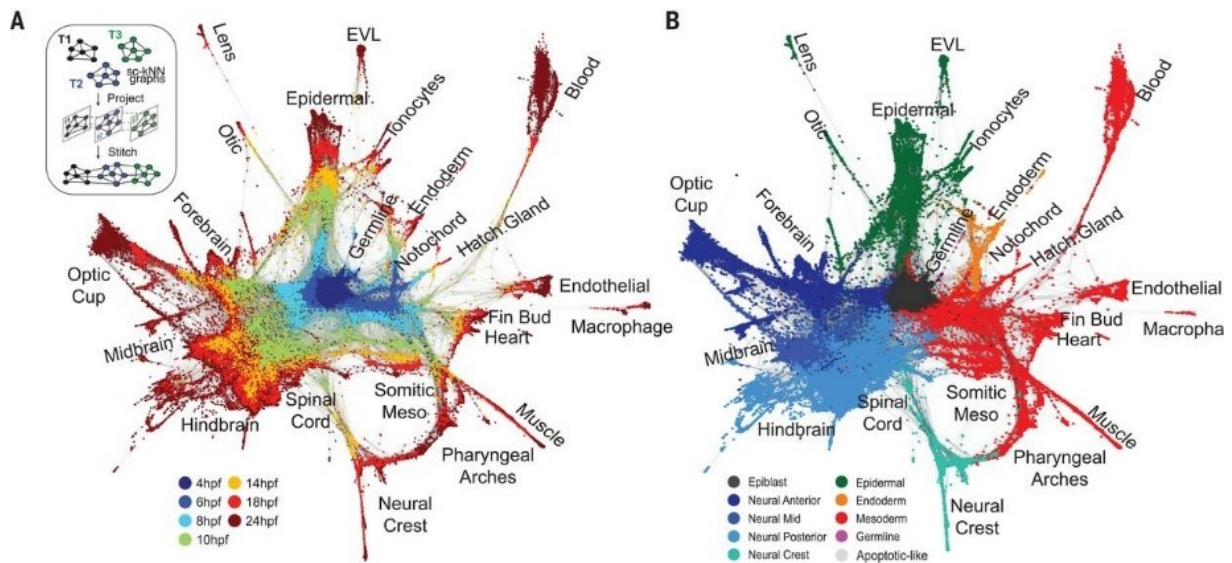


Obrázek č. 1. scRNAseq mapa embryogeneze dánia [7]

- (A) Buňky odebrané z jednotlivých stádií vývoje dánia jsou barevně označeny
- (B) Strom znázorňující body rozdělení jednotlivých linií na základě rozdílné genové exprese; barvy odpovídají barvám v (A)
- (C-F) Na stejné mapě jsou vyznačeny jednotlivé zárodečné listy buněk

Wagner a kolegové sledovali vývoj dánia od 4 hpf až po 24 hpf a podařilo se jim analyzovat 2 000 buněčných transkriptomů. Jeho data potvrzují a rozšiřují Farrellova pozorování. Za povšimnutí stojí zejména brzká diferenciacce krevní linie (kolem 10 hpf), která je v souladu s Farrellovým pozorováním (viz. obrázek č. 2). Wagner se snažil zjistit, zda se některé buněčné typy neskládají z různých konvergentních linií. Použil proto tzv. „tracing metodu“, která spočívá ve vnesení markeru do buněk a jeho následného sledování. Wagner

ukazuje, že buněčné linie nepředstavují strom, ale spíše krajinu, na jejímž poli se buňky „pohybují“ během změn jejich genové exprese [8].



Obrázek č. 2. scRNAseq mapa dánia [8]

- (A) Na základě odlišných expresí byla vytvořena mapa, barva značí stáří buněk při odebrání a analýze
 (B) Na stejné mapě bylo vyznačeno, z jakého zárodečného listu jednotlivé linie pocházejí

Farnsworth a kolegové se zaměřili na rozlišení buněčných linií dánia a jejich anotaci. Pro toto použili tzv. „shlukovací analýzu“. Cílem shlukovací analýzy je rozdělit dataset do oddělených populací. Farnsworthovým cílem bylo rozlišit a popsat buněčné linie dánia. Zanalyzovali celkem 44 000 transkriptomů buněk embrya dánia ze tří stádií, 1, 2 a 5 dpf. Podařilo se jim rozlišit 220 buněčných linií. Mezi těmito liniemi jsou rozděleny červené krvinky na dvě separátní populace, značící pravděpodobně embryonální a definitivní populace (není interpretováno Farnsworthem). Jako samostatná populace jsou také vyděleny progenitory červených krvinek. Mezi těmito liniemi jsou také rozděleny neutrofilové a makrofágy [10].

Sledování, která prováděli Farrell (do 12 hpf) a Wagner (do 24 hpf) byla značně časově limitovaná, protože první buňky definitivní vlny hematopoézy jsou pozorovány až kolem 24 hpf [44]. Farnsworth sice analyzoval dánio až do 5 dpf (tedy dokonce přesahující období embryogeneze končící 3 dpf), ale vývoj hematopoetických buněk není v této studii podrobně interpretován.

Mezi tracing metody patří i takzvaná metoda „zebrabow“. Spočívá ve vnesení genů pro fluorescenční proteiny (RFP, CFP a YFP) na několik míst v genomu. Indukcí rekombinace dochází nahodile ke změně barevnosti jednotlivých buněk. Tato barevná značka se poté

následně dědí v buněčné linii a umožňuje tak detailní sledování jejího vývoje. Tento přístup dokáže úspěšně mapovat vztah mezi mateřskou a dceřinou buňkou a je tak vhodný pro studie buněčných linií [45].

Další tracing metodou je LINNAEUS. Spočívá ve vnesení inzercí a delecí pomocí systému CRISPR Cas9. Tyto úpravy nazývá jizvami. Jizvy slouží jako značení (čárový kód) buněk, které jsou taktéž děděny v buněčné linii. Jizvy byly do embrya vneseny 10 hpf, a tak všechny následující dceřiné buňky mohou být následně vysledovány k jediné 10 hpf staré původní mateřské buňce. Tato metoda taktéž dovoluje úspěšně mapovat buněčné linie [46].

Protože scRNAseq analýza postrádá informace o původní lokaci dané buňky v rámci embrya, objevily se pokusy o kombinaci s jinými metodami, které by byly schopné tyto údaje definovat. Satija a kolegové zkusili použít přístup Seurat na embryích dána ve stádiu epibolie. Tento přístup spočívá v porovnání scRNAseq dat (metoda redukce dimenzionality) s referenční mapou vybraných genů, u kterých je známá jejich pozice v embryu dána. Cílem algoritmu Seurat je získat z expresních informací informace poziční kombinací expresního profilu jednotlivých buněk s referenčními geny. Satija potvrzuje, že metoda Seurat je vhodným přístupem pro rekonstrukci pozičních dat ze scRNAseq [47].

3. Hematopoéza v rybím modelu

Ze dvou zmíněných rybích modelů byla hematopoéza podrobněji studovaná na dánu. Proto bude v následující kapitole popsána na tomto modelu a až na závěr srovnána s informacemi dostupnými o hematopoéze medaky.

Následující tabulky č. 2 a č. 3 obsahují znaky používané pro rozlišení hlavních hematopoetických linií dána v citovaných studiích.

Markery primitivních hematopoetických buněk	
Primitivní erytrocyty	<i>gata1a</i> [20] <i>gata2a</i> [7, 20]
Primitivní makrofágy	<i>lcp1</i> [22] <i>drl*</i> [22]

Tabulka č. 2. Specifické znaky buněk primitivní hematopoézy dána

Definitivní hematopoetické buněčné linie a genová exprese							
HSCs	<i>itga2b^{low}</i> [19, 25] <i>lmo2</i> [48] <i>runx1</i> [23] <i>myb</i> [19, 48] <i>kdrl</i> * [19]	Lymfoidní prekurzory	<i>rag2</i> [19, 48] <i>igta2b^{low}</i> [25] <i>il7r</i> [19] <i>ccr9a</i> [19]	T buňky	<i>il7r</i> [19, 48] <i>trac</i> * [48] <i>lck</i> [19, 49] <i>cd4-1</i> [50] <i>cd8a</i> [50] <i>trbc1</i> * [50]	B buňky	<i>pax5</i> [48] <i>cd37</i> * [48] <i>cd79a</i> [48] <i>zgc:103700</i> * [19] <i>ighm</i> [19] <i>Ighz</i> * [19]
				T/NK buňky	<i>nkl.4</i> * [48, 50] <i>lck</i> [50]	<i>nitr1a</i> * [50] <i>dicp1.1</i> * [50]	
EMPs	<i>lmo2</i> [19, 48] <i>itga2b^{low}</i> [19, 25]	Myeloidní prekurzory	<i>nkl.4</i> [50] <i>mpx</i> [48] <i>lyz</i> [48] <i>cpa5</i> [48] <i>spi1b</i> [50]	Neutrofilly	<i>nkl.4</i> * [50] <i>lyz</i> [19] <i>mpx</i> [19]	DC	<i>zgc:103700</i> * [19]
				Makrofágy	<i>zgc:103700</i> * [19] <i>mpeg1.1</i> [51]	Eosinofily	<i>gata2a</i> [19]
		Erytroidní prekurzory	<i>lama1</i> [48] <i>slc4a1a</i> [48] <i>sptb</i> [48] <i>gata1a</i> [19, 48]	Erytroidy	<i>gata1a</i> [19]	Trombocyty	<i>itga2b^{high}</i> [19, 25]

Tabulka č. 3. Základní typy definitivních hematopoetických buněk dána a jejich specifické znaky

3.1. Primitivní vlna

K první produkci hematopoetických buněk dochází v ICM mezi 10-11 hpf. Byla zde mikroskopicky pozorována exprese *gata1a* a *gata2a* specifická pro buňky erytroidní linie [20]. Původní více než dvacet let stará pozorování byla podpořena scRNAseq analýzami, které první oddělení hematopoetické linie v embryogenezi stanovují taktéž na ~10 hpf [7, 8].

ICM se dá rozdělit na posteriorní laterální mezoderm („posterior lateral mesoderm“, PLM) a anteriorní laterální mezoderm („anterior lateral mesoderm“, ALM) (viz. Obrázek č. 3). V PLM dochází ke vzniku primárních erytrocytů a malé části myeloidních buněk. Hlavním místem vzniku primitivních myeloidních buněk (makrofágů) je ovšem ALM [52]. V ALM byly pozorovány makrofágy na základě exprese *lcp1* a *drl** již v čase 14 hpf. Odtud poté putovaly do žloutkového vaku (mezi 16-18 hpf) [22]. Kolem 24 hpf vstupují do žloutkového vaku také erytroidní buňky. Odtud začínají jak erytrocyty, tak makrofágy vstupovat 24 hpf do začínajícího krevního oběhu [20, 22].

3.2. Definitivní vlna

Buňky definitivní hematopoézy mají na rozdíl od buněk primární hematopoézy společný progenitor s buňkami endotelu („endothelial cells“, EC), vznikají totiž z DA [46]. Definitivní vlna je rozdělena na dvě fáze, v první vznikají EMP a v druhé HSC.

První známky vzniku EMP byly pozorovány 12 hpf a byly určeny na základě exprese *lmo2* [53]. EMP se začínají objevovat v AGM kolem 24 hpf (exprese *lmo2* a *gata1a*) [44].

AGM v dáníu značí oblast ohraničenou ventrální stranou DA a CV [23, 53]. Největší počet EMP buněk lze sledovat kolem 30 hpf. Zvětšení hematopoetické populace korespondovalo s rozvětčováním CV. 24 hpf byla CV nevětvená, zatímco 35 hpf byla už vysoce rozvětvená [23]. Eosinofilní a neutrofilní granulocyty byly pozorovány 48 hpf. Zralé trombocyty byly sledovány 72 hpf [44].

Ke vzniku a prvnímu pozorování HSC u savců (i u ryb) dochází také v AGM. V dáníu se HSC v AGM začínají objevovat kolem 30 hpf (na základě exprese: *myb*, *runx1*, *itga2b^{low}*) [23, 26].

Prostaglandin E2 (PGE2) podporuje vznik HSC v AGM. Přidání PGE2 k embryům dánía *in vitro* způsobilo zvýšení počtu HSC (*myb*, *runx1*). PGE2 je hlavní prostanoid produkovaný dáníem. Jeho produkce je regulována cyklooxygenázou 1 a 2 (COX1 & COX2). PGE2 hraje důležitou roli ve vývoji HSC buněk v AGM. COX1 je potřeba pro formaci EC aorty. Jak COX1, tak COX2 jsou exprimovány 48 hpf. Hrají roli ve formaci AGM nik a samotných HSC [54].

HSC vystupovaly z AGM nejdříve počátkem 32 hpf do krevního oběhu, a posléze obsazovaly CHT. Vstupovaly přes CV a nikoliv přes DA. Ke vstupu přes CV docházelo pouze v jednom místě a bez deformace, značící, že v určitém místě je endotel CV přerušen. Zároveň všechny buňky opouštějící AGM putující do CHT byly *itga2b^{low}*, tedy HSC buňky [23, 26].

Dělení HSC je přímo závislé na CHT [14, 55, 56]. CHT je definovaná expresí *klf6a* (mezi 33 hpf – 48 hpf). V mutantních modelech dánía (*klf6a^{-/-}*) se značně zmenšenou CHT byl pozorován menší počet HSC [55].

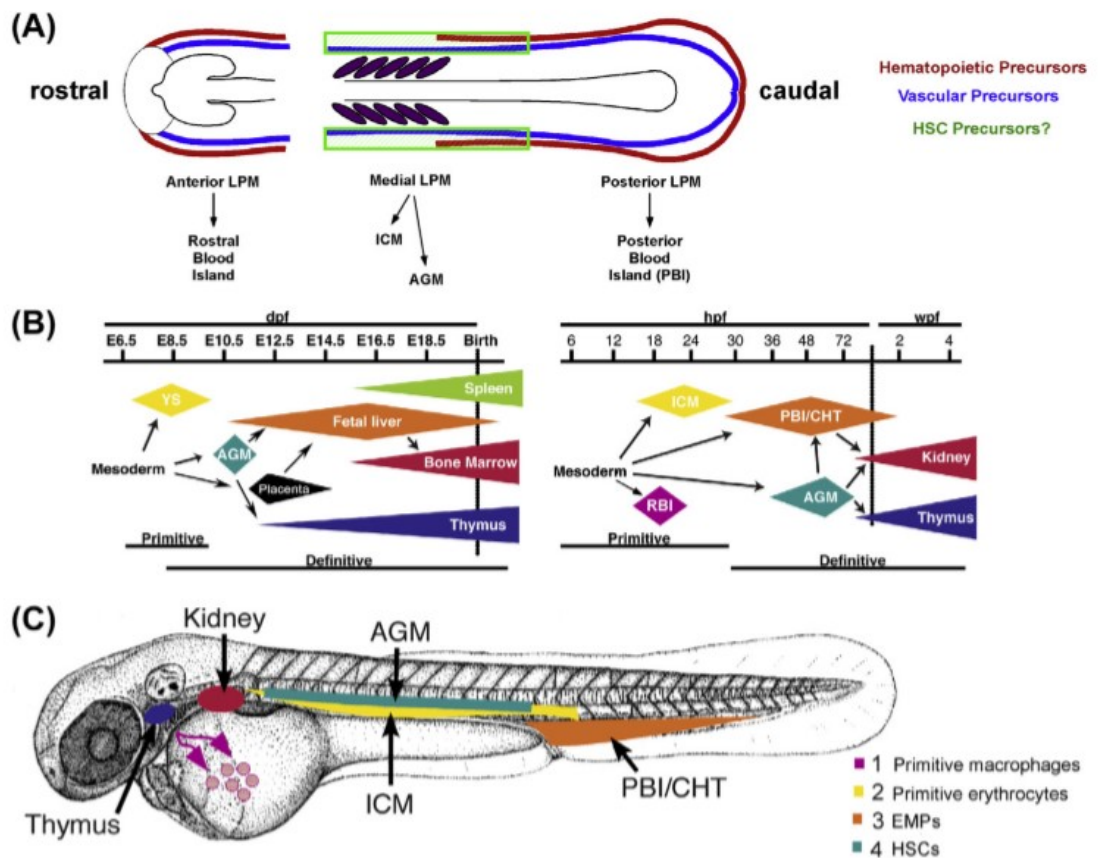
V CHT pozorujeme „kapsy“ z EC, které jsou považovány za hematopoetickou niku. Tyto kapsy vznikají po vstupu HSC do CHT seskupením pěti až šesti EC kolem jedné HSC. Tento jev byl nazván obejmutí endotelem, (anglicky „endothelial cuddling“) a byl také pozorován v embryonálních játrech myši. HSC se v kapsách dělí symetricky a asymetricky. Při symetrickém dělení zůstanou obě dceřiné buňky v kapse. Při asymetrickém dělení jedna dceřiná buňka setrvává v kapse a druhá ji opouští [23, 56].

Kapsu kromě EC tvoří také ocasní mesenchymální stromální buňky („caudal hematopoietic embryonic stromal tissue“, CHEST). CHEST buňky jsou charakterizovány expresí *cxcl12a*. Tyto buňky jsou ve velmi těsném kontaktu s HSC. O tom, která dceřiná buňka opouští kapsu po dělení HSC, rozhodovala jejich vzdálenost k CHEST buňce. Dceřiná buňka, která byla CHEST buňce blíže, v kapse zůstala [56].

Aby byl otestován vliv CHEST buněk na HSC, byla provedena izolace CHEST buněk z CHT. Byly k nim přidány buňky izolované z dřene ledvin („whole kidney marrow“, WKM).

CHEST a WKM buňky byly izolovány ze 72 hpf starých dánií (v 72 hpf již WKM obsahuje HSC buňky). CHEST buňky podporovaly růst WKM buněk *in vitro*. WKM buňky byly schopné dělení a diferenciace, pokud byly kultivovány v přítomnosti CHEST buněk. V nepřítomnosti CHEST buněk se WKM buňky nebyly schopné dělit a odumřely. CHEST buňky měly na WKM buňky efekt pouze tehdy, pokud s nimi byly v přímém kontaktu [14].

CHT je důležitou embryonální hematopoetickou oblastí, sloužící také jako místo, odkud dochází k migraci hematopoetických buněk do definitivních tkání dospělé hematopoézy – do ledvin a brzlíku [23, 25, 26].



Obrázek č. 3. Místa embryonální hematopoézy dánia [19]

- (A) Obrázek znázorňuje embryo dánia 12 hpf
 (B) Vlevo, hematopoéza u myšího embrya. Vpravo, hematopoéza embrya dánia. Stejně barevně označené tkáně u myši a dánia značí analogickou funkci tkáně
 (C) Obrázek znázorňuje 48 hpf staré embryo dánia s vyznačenými místy jednotlivých hematopoetických tkání

Brzlík je v průběhu embryogeneze i dospělosti kolonizován T buňkami. Proces migrace buněk do brzlíku začíná mezi 54 a 56 hpf, kdy byly T buňky (*itga2b^{low}*) prvně pozorovány v brzlíku. Migrace buněk trvá přes třináct hodin. T buňky nejprve vstupují do krevního oběhu a opouštějí jej do oblasti mesenchymu. Z mesenchymu putují buňky 7-9 hodin do brzlíku [26]. Brzlík dánia a medaky není v období embryonálního vývoje zásoben krví [57], vstup T buněk do brzlíku je tedy nezávislý na krevním oběhu [37]. Po vstupu T buněk do brzlíku nedochází k zastavení jejich migrace, vykonávají nadále pohyb, který má charakter vstupování a vystupování z a do brzlíku. Toto chování buněk bylo pozorováno i u 5 dpf starých jedinců [26, 37]. Hlavními chemokiny dánia důležitými pro migraci T buněk do brzlíku jsou *cxcl12a* a *ccl25a* [37, 58].

Migrace HSC buněk (*itga2b^{low}*, *myb*) do ledvin byla pozorována v AGM oblasti mezi 48 hpf až 96 hpf. Buňky migrovaly z posteriorní oblasti směrem k ledvinám podél pronefrických tubulů [25]. Tyto buňky migrovaly z CHT a v ledvinách byly pozorovány 5 dpf [24]. Jedná se tedy o rozdílný způsob migrace, než u buněk, migrujících do brzlíku.

3.3. Rozdíly hematopoézy mezi dániem a medakou

Hlavním rozdílem v hematopoéze dánia a medaky je její časování. Primitivní vlna v medace byla pozorována (na základě exprese *lmo2*) 34 hpf v ICM [21], zatímco v dániu již 10 hpf [20]. V medace začíná proudění krve 50 hpf [9], v dániu 24 hpf [20]. HSC (exprese *myb*) byly prvně u medaky pozorovány v oblastech AGM a CHT 58 hpf [21], zatímco v dániu byly HSC (*myb*) pozorovány už mezi 30-35 hpf [23, 26].

Lymfoidní buňky byly pozorovány (exprese *rag1*) od 4 dpf [59]. Brzlík medaky je obsazen malým počtem hematopoetických buněk kolem 5 dpf [58], v dániu první migrace do brzlíku začíná 54 hpf [26]. Hlavním rozdílem v hematopoéze dánia a hematopoéze medaky je tedy její rychlejší průběh u dánia.

3.4. Hematopoéza v dospělci

Výše bylo popsáno, jak a kdy se hematopoetické buňky přesouvají do orgánů dospělé hematopoézy kostnatých – ledviny a brzlíku. V této kapitole se krátce věnuji organogenezi a morfologii ledvin a brzlíku. Dále se věnuji tomu, jak vypadá HSC nika a jaké látky jsou důležité pro udržení HSC a jejich dělení – a které také slouží k řízení migrace (anglicky „homing“) HSC do ledvin při alotransplantaci.

3.4.1. Lokalizace HSC

Ledvina je u kostnatých hlavním orgánem dospělé hematopoézy [60]. Ledviny se u dána vyznačují expresí *gata3* [19]. Vznikají z ventrálního mezodermu, oblasti blízké původu hematopoetických linií. Během embryogeneze kostnatých vzniká dočasný pronefros, tvořený párem nefronů. Ten je po několika týdnech nahrazen mezonefrosem, který obsahuje několik stovek nefronů. U kostnatých nedochází ke vzniku metanefrické ledviny, kterou mají savci [61].

HSC sídlí ve WKM v blízkosti buněk nazvaných „zebrafish kidney stromal cells“ (ZKS). ZKS jsou stromální buňky s vlastnostmi fibroblastů hrající roli v udržování hematopoézy. ZKS produkují hormony (PGE2) důležité pro udržení, diferenciaci a proliferaci HSC. ZKS tvoří niku pro HSC v ledvinách kostnatých [15].

Výše bylo popsáno, jak PGE2 podporuje vznik HSC v AGM v embryogenezi. PGE2 hraje také roli v hematopoéze dospělého, především při regeneraci HSC (pozorováno po subletální dávce iradiace). Role PGE2 je evolučně konzervována se savci. V myši byla také prokázána role PGE2 při transplantacích HSC. Bylo ukázáno, že v modelech s vyšším obsahem PGE2 docházelo k přihojení většího množství HSC [54]. Dalšími látkami podporujícími produkci HSC a migraci HSC do ledvin u dána jsou ergosterol, fytosterol a vitamín D₂ (analog savčího vitamínu D) [62].

Zralé T buňky se vyskytují v brzlíku i v ledvinách (exprese *lck*). Transplantačním experimentem bylo zjištěno, že zralé T buňky odebrané z dospělých dánií, měly schopnost migrovat do brzlíku 48 hpf starých embryí [49]. Brzlík je u kostnatých párovým orgánem nacházejícím se v žaberní dutině [57]. *Foxn1* je specifickým markerem pro epitel brzlíku kostnatých [58].

Ve 3-4 týdnech po fertilizaci („week post fertilization“, wpf) dochází u dánií k zvýšení počtu zralých lymfocytů v brzlíku. Protilátková a cytotoxická odpověď začíná být u dána plně funkční mezi 4-6 wpf. Mezi 4-6 wpf je už tedy IS plně funkční [63].

Velikost brzlíku se zmenšuje s věkem a je spojena se snižováním imunokompetence organismu. Tento jev se nazývá involuce brzlíku. U jedinců dána začíná k involuci brzlíku docházet záhy po dosažení dospělosti, a to kolem 10-12 wpf [63]. U medaky byla pozorována involuce brzlíku později než u dána, ale přesný počátek zatím nebyl určen. U dvouletých jedinců byla velikost brzlíku dokonce větší než u tříměsíčních jedinců. Poté ale docházelo ke značné involuci a ve 3 letech byla velikost brzlíku poloviční oproti stavu u 3 - měsíční medaky [64].

B buňky sídlí v ledvinách (*rag2*) [49] a ve slezině kostnatých. Ta je jako slezina savců sekundární hematopoetickou tkání kostnatých [65]. Mukózní imunitní tkáň kostnatých se nachází na kůži, žábrech a střevním epitelu [66] cit. dle [65].

4. Funkční rozdíly IS ryb oproti savcům

Jednou z nejrychleji se vyvíjejících orgánovou soustavou je IS. IS kostnatých je ve značné řadě případů velmi podobný IS savců [50, 67, 68]. V této kapitole shrnuji základní imunologické děje kostnatých. Ději, kterými se zde zabývám, jsou zánět, fagocytóza, koagulace, aktivace komplementu a regenerace (součást přirozené imunity), protilátková a cytotoxická odpověď (součást adaptivní imunity).

Zánět je základní imunologickou reakcí na poškození ať už sterilní, či v kombinaci s infekčními patogeny. Zde se věnuji reakci na infekci bakteriemi. Jednou z cest aktivace imunitní odpovědi je reakce na lipopolysacharidy („lipopolysaccharide“, LPS) přítomné na povrchu bakterií. U savců jsou LPS rozpoznávány TLR4-komplexem, který však u dánia i medaky chybí. U dánia byla zjištěna silná zánětlivá odpověď na LPS, která je schopná způsobit sepsi a smrt jedince, ale způsob signalizace zatím nebyl zcela prozkoumán. Při srovnání genové exprese průběhu zánětu bylo 75 % genů ortologních s myší. V dániu byla potvrzena přítomnost MAP kinázové dráhy a TLR signální dráhy, přestože je mechanismus aktivace TLR pomocí LPS neznámý [67].

Specifickou vlastností dánia je jeho schopnost využít H_2O_2 jako chemoatraktant při zánětu. Živočichové běžně využívají H_2O_2 pouze pro signalizaci uvnitř buňky. H_2O_2 má antiseptické vlastnosti a ve vyšších koncentracích je uvnitř buněk použit pro ničení patogenů. Při vytvoření rány na ocasu dánia, začaly epiteliální buňky vylučovat H_2O_2 do mimobuněčného prostoru, což způsobilo migraci leukocytů do místa zranění [69].

Fagocytóza je zásadní imunitní děj, při kterém dochází k pohlcování částic buňkami IS. Hlavními fagocytujícími buňkami jsou neutrofilové, monocytové, makrofágové a dendritické buňky. Fagocytóza u ryb je funkčně podobná savcům. Největší počet fagocytů byl pozorován ve střevě a slezině, velké počty se nacházely také v ledvinách a brzlíku [70]. Makrofágy byly již v raném stádiu (30 hpf) schopné fagocytovat bakterie a ochránit tak embryo před infekcí [22].

Koagulace je proces srážení krve zastavující krvácení. U savců i jiných obratlovců se jedná o nezbytný proces udržení homeostázy organismu. V koagulaci kostnatých i savců hrají zásadní roli fibrinogeny (*fga*, *fgb* a *fgg*). Pokud byla produkce fibrinogenu v dániu poškozena, dánia trpěly hemoragií [71].

Komplement je dalším důležitým hráčem v ochraně organismů proti infekci. U dánia byla zaznamenána exprese všech genů komplementu 2 hpf. Třemi dráhami aktivace komplementu jsou klasická cesta, alternativní cesta a lektinová cesta. Ve stádiu líhnutí dánia může dojít k aktivaci komplementu pouze pomocí alternativní cesty [72].

Na rozdíl od savců mají kostnatí jaderné trombocyty [73] a také jaderné erytrocyty. Hlavní role erytrocytů je přenos kyslíků do tkání, u kostnatých navíc hrají roli v imunitní odpovědi. U jiného zástupce nadřádu kostnatých, Tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) je většina genů exprimovaných erytrocyty společná leukocytům. Podrobně u nich bylo zkoumáno 7 genů TLR signální dráhy. Při injekci poly(I:C) stimulantu (který slouží k simulaci virové infekci) došlo ke zvýšení exprese těchto genů, jak u erytrocytů, tak i u leukocytů [74]. Červené krvinky dalších zástupců kostnatých byly schopné imunitní odpovědi na virové a bakteriální infekce, např. tvořily zánětlivé cytokiny [75].

Schopnost regenerace je u nižších obratlovců včetně dánia řízena jiným způsobem než u savců. Nižší obratlovci mají mnohem vyšší regenerativní potenciál (na úrovni schopnosti regenerace celých tkání). Tato regenerace je nazývána epimorfická regenerace, ve které hrají výraznou roli buňky přirozeného IS, a to konkrétně makrofágy. Při amputaci ocasní ploutve 3 dpf starého dánia putovaly makrofágy k místu amputace a setrvaly zde, dokud se tkáň plně nezregenerovala (3 dny po amputaci). Při ablaci makrofágů k regeneraci také dojde, ale její proces je zpomalen [76].

Dánia mají velmi robustní přirozenou imunitu. Adaptivní IS není zcela zásadní pro přežití jedince v přítomnosti patogenů, jako je tomu například u myši, které bez něj rychle umírají [77]. Tento robustní přirozený IS byl testován na mutantním modelu dánia *rag1^{-/-}*, který má značně redukováné počty lymfoidních buněk. Zatímco počet lymfoidních buněk je snížen, počet neutrofilů je v tomto modelu vyšší, než u divokého typu [78]. Tyto modely měly také zvýšenou hladinu exprese genů komplementu a koagulace [79].

Výsledky jedné studie naznačují, že by dánio mohlo disponovat jistou přirozenou imunologickou pamětí. Hohn a kolegové vpravili do dospělého modelu dánia *rag1^{-/-}* atenuované intracelulární bakterie *Edwardsiella ictaluri*. V různých časových intervalech pak byly do těchto modelů injikovány neatenuované *Edwardsiella ictaluri*. Hohn zaznamenal rozdíl mezi úmrtností modelů, které byly podrobeny imunizaci atenuovanými bakteriemi a mezi těmi, které jí podrobeny nebyly [80]. Tato přirozená imunologická paměť ovšem nebyla sledována v novější studii, provedené Tokunagou a kolegy. V této studii použili k imunizaci dospělých *rag1^{-/-}* dánií extracelulární bakterie *Vibrio anguillarum*. Nepotvrdili rozdíl v

úmrtnosti mezi imunizovanými a neimunizovanými *rag1^{-/-}* modely. Tokunaga navrhuje, že důvodem by mohlo být použití extracelulárních oproti intracelulárním bakteriím [77].

Tokunaga dále zkoušel, zda je *rag1^{-/-}* dánío schopné vyvinout přirozenou imunologickou paměť proti transplantovaným alogenním červeným krvinkám. Ty však také nebyly schopny imunizace *rag1^{-/-}* modelu dánía [77].

Stejně jako u savců, hrají NK buňky kostnatých roli v přirozené cytotoxické odpovědi [81]. NK buňky rozeznávají přítomnost MHC I receptorů na buňkách. Ty, které neobsahují MHC I vlastní danému organismu (cizí buňky a vlastní buňky se sníženou expresí MHC I) jsou NK buňkami zabity [32]. U kostnatých byla potvrzena jejich role v reakci proti alogenním transplantovaným buňkám [81].

T buňky kostnatých mají mnoho ortologních genů se savci. Některé aspekty fungování T buněk kostnatých nejsou nadále důkladně prozkoumány. Obecně je ale funkce T buněk považována za konzervovanou se savci [82].

B buňky kostnatých mají některé charakteristiky myeloidních buněk, byla u nich např. pozorována fagocytóza. Zdá se tedy, že funkce B buněk je vysoce plastická a hranice vlastností B buněk a myeloidních buněk není tak jasná jako u savců. Nejvíce vytvářeným typem protilátek kostnatých je IgM, dále také vytváří IgT/Z a IgA [65].

4.1. Indukce tolerance v rybách při xenotransplantacích

Navození tolerance vůči cizorodým biologickým materiálům je možné deplecí buněk IS, především NK a T buněk, u kterých byla potvrzena role v odmítnutí alogenních i xenogenních transplantátů [81].

Deplece buněk IS se provádí iradiací. Standardně se používá (15 Gy) γ -radiace. Dalším možným způsobem je chemická deplece, a to např. ponořením do látky dexametazon (100 μ g/ml, 5 dpf stará embrya) [49].

Existují však i jiné metody pro navození tolerance, a to indukována tolerance předchozí imunizací. Toto bylo sledováno u xenotransplantací lidských rakovinných buněk do dánía. Byly použity rakovinné buňky prostaty (PC-3), chronické myeloidní leukémie (K562) a hepatokarcinomu (HepG2). Rakovinné buňky byly ozářeny a byly transplantovány do žloutkového vaku 48 hpf dáníí. Po měsíci bylo naživu 70 % těchto ryb a všechny transplantované buňky vymizely. V práci není specifikováno, zda došlo k odstranění těchto buněk pomocí IS, nebo zda rakovinné buňky nebyly v dáníích životaschopné. Když tyto ryby dosáhly stáří 3 měsíců, byly do nich transplantovány neozářené rakovinné buňky. Ty nebyly odmítnuty a následně došlo k jejich proliferaci vedoucí k úmrtí příjemce. U kontrolní skupiny,

do které 48 hpf nebyly transplantovány ozářené buňky, došlo k imunitní reakci proti rakovinným buňkám a přežití jedinců [83].

5. Transgenní – mutantní – inbrední modely

Příbuzenské křížení (plemenitba), z anglického „inbreeding“, tedy křížení mezi sourozenci, je používáno jako metoda pro vytvoření a udržení homozygotních jedinců (a mutantních modelů). Výsledkem je vysoká homozygotita populace vedoucí k projevům mutovaných recesivních alel, ty způsobují snižování fitness jedinců. V extrémních případech může příbuzenské křížení vést k vyhynutí vysoce inbrední populace. Tento jev se nazývá inbrední deprese („inbreeding depression“) [84]. Některé druhy organismů jsou k němu náchylnější než jiné. Dánio a medaka se v těchto ohledech zásadně liší. Zatímco dánio k němu náchylné je [84], medaka nikoliv [85].

U dánia je především důležitý stupeň inbreedingu samice, kdy hybridní samice produkují větší počet embryí než inbrední [84]. U medaky bylo zaznamenáno až 80 inbredních generací [86] cit. dle [85]. Pro tuto vlastnost byly medaky vybrány pro výše zmíněný ERC grant.

Existuje velké množství divokých linií dánia, přičemž mezi nejběžněji používanými se řadí např. AB (wt) [87] nebo *Tübingen* (TU) [88]. U medaky rozlišujeme čtyři hlavní divoké populace [4]. Především dánio se vyznačuje relativně velkým počtem transgenních a mutantních modelů.

První skupinou jsou transparentní modely. Dlouhodobé mikroskopické sledování vyžaduje průhlednost dospělých jedinců. Pigmentace u divokých modelů dánia začíná 24 hpf, kdy se prvně začínají objevovat melanocyty. 5 dpf má dánio asi 600 těchto pigmentových buněk [89]. U medaky se prvně pigmentové buňky objevují ve 38 hpf [9].

Transparentním modelem dánia je *casper*. Tento model se vyznačuje kompletní absencí všech melanocytů v průběhu embryogeneze a dospělosti, takže je téměř celý transparentní. Oko zůstává barevné díky pigmentovým sítnicovým epitelialním buňkám, ale chybí reflektivní iridofory. Tito dvojité mutanti (*mitfa*^{-/-}, *mpv17*^{-/-}) jsou plně životaschopní [90].

Dalším transparentním modelem dánia je *crystal*. Je fenotypově velmi podobný jako *casper*, tj. s chybějícími pigmentovými buňkami. Oproti mutantu *casper* se *crystal* vyznačuje i chybějícím pigmentem v sítnicovém epitelu. *Crystal* jedinci jsou plně životaschopní, neprokazují žádné abnormality v chování a počty jejich potomků jsou normální. Jedná se o trojitě mutanty (*mitfa*^{-/-}, *mpv17*^{-/-}, *slc45a2*^{-/-}) [91].

Existuje několik transparentních modelů medaky. Model *heino* byl popsán už před více než třiceti lety [92, 93]. Vyznačuje se chybějícími pigmentovými buňkami a průhledným narůžovělým tělem. Oči jsou pigmentované [94]. Jedná se o „albino“ (*i-3^{-/-}*) mutanta [93]. Vylepšení průhlednosti *heino* modelu je tzv. „see-through“ medaka. Jedná se o čtyřnásobného mutanta (*gu^{-/-}*, *i-3^{-/-}*, *if^{-/-}*, *il-1^{-/-}*). Jak *heino*, tak see-through medaka jsou plně životaschopné s normálním počtem potomků [94]. Dalším transparentním modelem medaky je *QuiH*. Tento model se vyznačuje kompletní absencí všech pigmentových buněk [4].

Další skupinou modelů jsou mutanti s poškozenou hematopoézou a/nebo narušenou funkcí IS, umožňují provádění transplantací buněk bez nutnosti iradiace/imunodeplece dospělců.

Imunodeficientním modelem dánia je mutant v *gata1a^{-/-}*, dříve přezdívaný „bloodless“. Tito mutanti jsou charakterizováni téměř kompletní absencí krevních buněk a krevního oběhu. Byli popsáni již před více než dvaceti lety a označeni jako *vmp^{m62}/vlt^{m651}*. Takovíto homozygotní *gata1a^{-/-}* mutanti nevytvářejí žádné, nebo pouze minimální množství krevních buněk do 5 dpf. Po 2 wpf jsou neschopni nafouknutí plovacího měchýře a umírají [95]. Tato mutace byla později popsána jako způsobená genem *gatala* [96]. Model *gata1a^{-/-}* může být použit jako model pro transplantaci HSC, ta byla v případě alotransplantace úspěšná i bez ozáření [97].

Dalším imunodeficientním modelem dánia je mutantní model *rag2^{E450fs^{-/-}}*. Je to model se sníženým počtem funkčních T a B buněk. Počty myeloidních buněk nejsou touto mutací ovlivněny a nejsou oproti WT sníženy. Homozygotní *rag2^{E450fs^{-/-}}* mutanti jsou životaschopní i schopni rozmnožování, i když s menším množstvím potomků než u jejich heterozygotních sourozenců. Tento model byl také použit pro alotransplantaci HSC za současného ozáření [36].

Podobným imunodeficientním mutantem je výše zmíněný model dánia *rag1^{-/-}*. V tomto modelu nedochází k vývoji brzlíku a sledujeme kompletní absenci adaptivní imunity. Model je schopný přežít alespoň po dobu 2 let [77].

Imunodeficientní mutant dánia *myb^{-/-}* je také typ mutanta s chybějící hematopoézou. Homozygotní *myb^{-/-}* mutanti rostou pomaleji, než divoké linie, a postupně u nich dochází k ubývání počtu cirkulujících krevních buněk, od 20 dpf nejsou žádné takové buňky detekovatelné. Tito mutanti jsou menší a nikdy u nich nedojde k pohlavní dospělosti. Můžeme u nich sledovat anemii, doprovázenou srdečním edémem. Přestože nemají detekovatelné krevní buňky již 20 dpf, tito mutanti se dožívají překvapivě až 2-3 měsíců [98]. Možné využití tohoto modelu je taktéž na transplantaci, byla u něj provedena alotransplantace bez ozáření s přijmutím buněk [99].

Imunodeficientní model medaky *beni fuji (bef)* je také mutantem v *myb^{-/-}*. Tento mutant se vyznačuje úplnou, nebo téměř úplnou nepřítomností cirkulujících červených krvinek. Tento mutant se dožívá pouze asi 10-11 dpf [21].

Modely s expresí lidských genů se nazývají humanizované ryby, takovým modelem je např. GSS dáanio. To produkuje lidské cytokiny hrající roli v lidské hematopoéze, konkrétně cytokiny GM-CSF, SCF a SDF1 α . Bylo využito pro xenotransplantační experiment s lidskými HSC. Cytokiny produkované touto rybou slouží jako chemoatraktanty důležité při migraci lidských HSC do ledvin [100].

Poslední skupinou jsou transgenní modely, především modely s fluorescenčně značenými buňkami IS. Existuje nespočet transgenních fluorescenčních reportérových modelů dánia a medaky. Jedná se o modely, které mají do promotoru cíleného genu vložený gen pro fluorescenční protein. Pro studium hematopoézy se používají především modely s označenými markery buněk hematopoézy, EC, epitelu ledvin, nebo brzlíku. Např. model se značenými EC *kldr::mCherry* byl použit pro xenotransplantaci lidských HSC [35]. Výhodné je spojení kombinace transparentního a transgenního modelu, umožňující sledovat fluorescenci *in vivo* u dospělců. Např. dáanio *Fli::GFP casper*, ve kterém jsou značeny EC - tento model byl také využit pro xenotransplantaci lidských HSC [34].

6. Transplantace krevních buněk

Alotransplantace i xenotransplantace HSC byly do současné doby provedeny pouze na modelech dánia. V první části popisují alotransplantační experimenty a v druhé se věnují xenotransplantačním experimentům lidských HSC do dánia, tyto experimenty byly do současnosti provedeny jenom tři. Věnují se také jednomu experimentu xenotransplantace lidských makrofágů.

Aby se transplantované HSC mohly přihojit, je třeba, aby v příjemci byly volné hematopoetické niky. V myším modelu bylo zkoumáno, kolik volných HSC nik se nachází u myší. Při transplantačních experimentech do imunitně nekompromitovaných myší bylo zjištěno, že 0,1-1 % HSC nik je volných a schopno přijmout transplantované HSC buňky [29]. U dánia a medaky nebyly v současnosti takovéto kompetitivní testy, zkoumající počet volných nik ať už u divokých, či mutantních jedinců provedeny.

6.1. Alogenní transplantace HSC u ryb

Alotransplantace jsou transplantace mezi geneticky odlišnými jedinci stejného druhu, v tomto případě mezi jedinci dánia. Popisují zde tři transplantační experimenty HSC. Každý

z těchto experimentů používá jiné metody, modely a ozáření či neozáření příjemců. Výsledky a metody těchto alotransplantací naznačují možný směr, který by mohl být prozkoumán i budoucími xenotransplantačními experimenty.

První zmiňovaný experiment byl proveden Traverem v roce 2003. Jako příjemce použil mutantní model dánia *gata1a^{-/-}*. Tento model je za normálních okolností letální, jedinci se nedožívají více než 14 dpf. Jako dárce HSC byl použit transgenní model *gata1a:EGFP*. Z dospělých dárců byla vyňata WKM a transplantována do 48 hpf starých příjemců. Tito *gata1a^{-/-}* mutanti byli zachráněni a stejně tak byla obnovena jejich hematopoéza. Přibližně 50 % takovýchto ryb přeživalo po dobu několika měsíců. Analýzou 6 měsíců starých zabitých ryb bylo zjištěno, že všechny erytrocyty byly původem z dárce (na základě jejich exprese GFP). Traver a kolegové ukazují, že HSC se mohou úspěšně přihojit. Lze takto zachránit letálního mutantu a udržovat jeho hematopoézu. Poslední zmínka o pozorování dárcovských buněk je po uplynutí 8 měsíců od transplantace. Nenalezli také žádné známky GVHD [97].

Hess a kolegové použili mutanty *myb^{-/-}* dánia jako příjemce. Jako dárce použili transgenní *ikaros:EGFP* model dánia. WKM z dárců byla transplantována do 6-9 wpf dáníí. Úmrtnost byla asi 50 %, velká část transplantovaných ryb přežila své sourozence, kteří byli také homozygotní pro *myb* a nebyli transplantováni. Transplantovaní mutanti rostli, začal se u nich projevovat sexuální dimorfismus a došlo ke ztrátě srdečního edému (který se projevuje u fenotypu *myb^{-/-}*). Po 5 týdnech po transplantaci byli okem nerozeznatelní od divokých linií a byli schopni přežít více než 8 měsíců. Tito mutanti byli schopni přijmout HSC a docházelo k jejich přihojení bez nutnosti iradiace [99].

Tang použil dospělý mutantní model *rag2^{-/-}* dánia jako příjemce. Jako dárce použil - 3.5subb: *EGFP* transgenní dospělý model dánia. HSC buňky odebral z WKM dárce. Příjemce podrobil iradiaci (10 Gy), aby došlo k uvolnění hematopoetické niky. Transplantované buňky byly v modelu sledovány alespoň po dobu 45 dní po transplantaci oproti divokým kmenům, kde běžně docházelo k odmítnutí transplantátu po 25 dnech. Takovýto model je schopný dlouhodobého přihojení HSC, ovšem za současné iradiace [36].

Data z těchto tří experimentů shrnuji v následující tabulce č. 4.

Autor	Dárce	Stáří dárce	Tr. buňky	Příjemce	Iradiace příjemce	Stáří příjemce	Místo transplantace	Transplantované buňky detekované nejdéle do
Traver 2003	dánio <i>gatala: EGFP</i>	dospělec	WKM	dánio <i>gatala^{-/-}</i>	Ne	48 hpf	žilní zátoka	8 měsíců po transplantaci (experiment ukončen)
Hess 2013	dánio <i>ikaros: EGFP</i>	dospělec	WKM	dánio <i>myb^{-/-}</i>	Ne	6-9 týdnů	oko (retro-orbitální injekce)	8 měsíců po transplantaci (experiment ukončen)
Tang 2014	dánio <i>3.5ubb: EGFP</i>	dospělec	WKM	dánio <i>rag2^{E450fs/-}</i>	Ano	dospělec	pobřišní dutina	45 dnů po transplantaci (experiment ukončen)

Tabulka č. 4. Alotransplantace HSC buněk dánia [36, 97, 99]

I přes použití odlišných mutantních příjemců lze sledovat společný rys, a to, že se jedná o modely s poškozenou hematopoézou. Traver ani Hess nepoužívali iradiaci, fenotyp modelů *gatala^{-/-}* a *myb^{-/-}* je bez hematopoézy, aby nedošlo k odmítnutí IS příjemce. Model *rag2^{E450fs/-}* působí pouze na vývoj T a B buněk. Tang zdůvodňuje iradiaci jako prostředek k uvolnění hematopoetických nik.

Ve všech experimentech se povedlo nastolit chimérní stav. Transplantované buňky byly detekované ve všech studiích při posledních měřeních. Tang, u kterého bylo sledování nejkratší, dodává, že ve 45 dnech byly transplantované buňky hojně rozšířeny. Dá se s vysokou pravděpodobností předpokládat, že tento stav by byl udržen i po ukončení experimentů.

6.2. Rybí model jako příjemce lidských hematopoetických buněk

Vůbec první, kdo provedl xenotransplantaci lidských HSC do modelu dánia, byl Staal. Jako příjemce byl použit transgenní model dánia *Fli:: GFP casper* (transparentní model se značenými EC). Lidské HSC byly izolovány z pupečnickové krve („umbilical cord blood“, UMB). HSC buňky byly vyříděny na základě exprese CD34 (a označeny fluorescenční barvou PKH26). Tyto buňky byly transplantovány do 48 hpf starých příjemců. Příjemci nebyli podrobena iradiaci [34].

Buňky byly injikovány do CV. Během několika hodin se přesunuly z místa vpichu do CHT. Lidské HSC byly v příjemci detekovány pomocí průtokové cytometrie pouze do 6 dnů po injekci („day post injection“, dpi). Kromě lidských HSC buněk byly detekovány i lidské buňky myeloidní linie, značící diferenciaci a proliferaci HSC v dániu [34].

Další xenotransplantaci lidských HSC do dánia provedla Noémie Hamilton. Jako příjemce zvolila transgenní model dánia *kdrl:HRAS-mCherry-CAAX* (značené EC). Lidské HSC byly izolovány z periferní krve dospělých dárců na základě exprese CD34 (a označeny fluorescenční barvou CD34-eFluor450). HSC buňky byly injikovány do 52 hpf starých příjemců do CV. Příjemci nebyli ozařováni [35].

Již 1 hpi byla sledována migrace transplantovaných buněk do CHT. Hamilton sledovala „obejmutí endotelem“, tedy interakci lidských HSC s kapsami CHT, která byla dříve popsána jako jev interakce HSC dánia a EC. Bylo také pozorováno dělení HSC. Lidské HSC demonstrovaly i další chování podobné vlastním HSC dánia, např. způsob valení se podél EC [35].

Hamilton ukončila experiment po dosažení 5 dpf příjemců. Její sledování však končí mnohem dříve, a to dokonce již 13 hpi. Vidíme, že ve 13 hpi byl spočten úbytek detekovatelných transplantovaných buněk na 50 % [35]. Pokud by úbytek pokračoval stejnou rychlostí, žádné transplantované buňky by po 24 hpi nebyly v příjemci detekovatelné.

Nejnovější xenotransplantace lidských HSC byla publikována Rajanem. Jako příjemce zvolil GSS model dánia. HSC buňky byly transplantovány do CV do 72 hpf starých ozářených GSS a *casper* dánií. U dánií *casper* byly pozorovány HSC buňky (na základě fluorescence) do 28 hpi. Zatímco u GSS dánií ještě ve 48 hpi, kdy ovšem fluorescence vyhasla. Rajan poté analyzoval RNA GSS dánií na přítomnost lidských hematopoetických markerů 72 hpi a jejich přítomnost potvrdil. Toto je nejzazší měření provedené Rajanem. Dle Rajana hrála přítomnost lidských cytokinů podíl na tom, zda lidské HSC byly schopné sebeobnovy v modelu dánia či nikoliv [100].

Paul a kolegové vytvořili humanizovaný model dánia, transplantací lidských monocytů/makrofágů. Makrofágy byly transplantované do mozkové oblasti 3 dpf starých dánií, kde přežívaly až po dobu jednoho týdne. Při vpichu makrofágů do 3 dpf starých embryí dánia přímo do jejich krevního oběhu, byly už 3 hodiny po vpravení makrofágy pozorované v celém dániu a následně v tkáních přežívaly alespoň po dobu jednoho týdne. Makrofágy transplantované do dánia 2 dpf byly pozorované v hlavě a v ocase 14 dní po vpichu [101]. Jedná se tedy o nejdelší sledování transplantovaných lidských hematopoetických buněk v modelu dánia.

Pozorování popsaná výše jsou shrnuta v následující tabulce č 5.

Autor	Dárce	Zdroj	Značení transpl. buněk	Příjemce	Iradiace příjemce	Stáří příjemce	Místo transplantace	Transplantované buňky detekované do
Staal 2015	člověk	UCB(sortování HSC (CD34 ⁺))	PKH26	dánio <i>Fli::GFP casper</i>	Ne	48 hpf	CV	6 dpi
Hamilton 2018	člověk	Periferní krev, dospělí dárce(sortování HSC (CD34 ⁺))	CD34-eFluor450	dánio <i>kdrl:mCherry</i>	Ne	52 hpf	CV	13 hpi
Rajan 2019	člověk	UCB(HSC)	CMFDA	GSS dánio	Ano	72 hpf	CV	3 dpi (experiment ukončen)
Paul 2018	člověk	Makrofágy	Green or Deep Red, Invitrogen	dánio <i>mpx:GFP /flk:mCherry 637</i>	Ne	48 hpf	CV	2 týdny po transplantaci

Tabulka č. 5. Xenotransplantace lidských hematopoetických buněk do modelu dánia [34, 35, 100, 101]

V současné době byly provedeny pouze tři studie na transplantaci lidských HSC do modelu dánia. Poznatky z této oblasti jsou tedy značně omezené. Ze známých informací je jisté, že dánio je dostatečně konzervováno se savci a s člověkem v evoluci, aby mohlo docházet k migraci HSC do hematopoetických nik v CHT dánia [34, 35] a k jejich úspěšnému dělení [35]. Ovšem dlouhodobé osídlení nik zatím nebylo prokázáno. Staal byl schopen HSC pozorovat pouze do 6 dpi a Hamilton sledovala model pouze do 13 hpi, Rajan sledoval pouze do 3 dpi, a tak nejsou k dispozici žádná data o úspěšnosti dlouhodobého přihojení.

V Rajanově xenotransplantačním experimentu lidských HSC do GSS dánia byla sledována migrace lidských HSC do ledvin [100]. Staal a Hamiltonová pozorovali migraci pouze do CHT nikoliv do ledvin [34, 35]. Navíc, pouze v GSS modelu, nikoliv v kontrolním modelu *casper*, byly lidské HSC schopné samoobnovy [100].

Směr, kterým by se další zkoumání přihojení lidských HSC mohlo ubírat, je použití humanizovaných modelů dánia a medaky a sledování, zda je v těchto modelech možné dlouhodobé přihojení lidských HSC.

7. Závěr

Dánio a medaka jsou dobře zavedené modelové organismy. Procesy embryogeneze jsou u obou těchto modelů kvalitně popsány, a to v případě dánia velmi podrobně. U obou modelů se jedná o rychlý proces – zatímco u medaky probíhá po dobu 9 dní, u dánia trvá embryogeneze pouze 3 dny. Pomocí nové techniky scRNAseq jsme schopni definovat vztahy mezi

vyvíjejícími se buňkami a sledovat diferenciaci jednotlivých buněčných linií. Existují i metody, které umožňují k takto získaným datům zpětně přiřadit poziční informaci. Zároveň také přispívají k poznání specifikace hematopoetických linií a posloužily i k potvrzení starších hematopoetických pozorování.

Hematopoéza dána a medaky probíhá podobně jako u savců ve dvou po sobě jdoucích vlnách, a to primitivní a definitivní. V primitivní vlně vznikají erytrocyty nutné k okysličování rychle se zvětšujícího embrya a makrofágy tvořící ranou obranu embrya před patogeny. V definitivní vlně sledujeme vznik dvou odlišných hematopoetických populací, a to EMP a HSC. HSC posléze v průběhu vývoje dána a medaky osidlují jejich ledviny a odtud následně dochází k obnově celého krevního systému po zbytek jejich života. Dospělým místem hematopoézy kostnatých je také brzlík, slezina a mukózní tkáň.

IS kostnatých je do značné míry konzervován s IS savců. Základní procesy IS včetně zánětu, koagulace a komplementu se podobají savcím procesům. Naopak některé prvky IS jsou zcela odlišné, jako je tomu například u regenerace, která se spíše podobá mechanismům popsaným u nižších obratlovců. Velkým rozdílem je také robustní přirozená imunita a přítomnost jaderných erytrocytů a trombocytů. Jaderné červené krvinky kostnatých se dokonce přímo podílejí na imunitní obraně organismu.

Existence velkého množství modelů je velkou výhodou dána a medaky. Jsou to především modely transparentní, imunodeficientní a transgenní. Velkou výhodou medaky je její vysoká tolerance vůči inbrední depresi, která umožňuje vytvoření velkého počtu inbredních modelů.

Model dána dovoluje pro navození tolerance při xenotransplantacích lidských rakovinných buněk pomocí předchozí imunizace embryí, které zatím nejsou plně imunokompetentní. Zbývá zjistit, zda by podobného účinku šlo dosáhnout při imunizaci xenotransplantací lidských HSC.

Diskutované transplantační experimenty odhalily slabé stránky hematopoetického transplantačního výzkumu u modelů malých ryb. Zatímco model dána byl podrobně prozkoumán v oblasti alotransplantací HSC, model medaky v tomto ohledu zatím vůbec probádán nebyl. Stejně tak nebyl model medaky doposud využit pro xenotransplantace lidských HSC. Malé množství xenotransplantací lidských HSC u dána ukázalo, že tento model není vhodný pro dlouhodobé sledování lidských HSC, jelikož zatím nebyla pozorována schopnost dlouhodobého připojení. U dána byla nicméně dokumentovaná migrace lidských HSC do embryonálních a dospělých hematopoetických tkání a stejně tak byla sledována i diferenciaci

lidských HSC. Jistou naději pro dlouhodobé přihojení tedy představuje využití humanizovaných modelů dána.

Úspěšné vytvoření ryb s lidskou hematopoézou by mohlo otevřít nové možnosti pro navazující výzkum. Takovéto modely by mohly být využity např. k vytvoření infekčních nebo rakovinných modelů a sledování interakcí lidského IS *in vivo*.

8. Seznam použité literatury

- [1] NUSSLEIN-VOLHARD, Christiane a Ralf DAHM. *Zebrafish*. B.m.: OUP Oxford, 2002. ISBN 978-0-19-963808-6. (Str.1-3, 59)
- [2] PASQUIER, Jeremy, Cédric CABAU, Thaovi NGUYEN, Elodie JOUANNO, Dany SEVERAC, Ingo BRAASCH, Laurent JOURNOT, Pierre PONTAROTTI, Christophe KLOPP, John H. POSTLETHWAIT, Yann GUIGUEN a Julien BOBE. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics*. 2016, **17**(1), 368. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:[10.1186/s12864-016-2709-z](https://doi.org/10.1186/s12864-016-2709-z)
- [3] DETRICH, H. William, Monte WESTERFIELD a Leonard I. ZON, ed. *Essential zebrafish methods: genetics and genomics*. Amsterdam: Elsevier, Academic Press, 2009. Reliable lab solutions. ISBN 978-0-12-375160-7. (Str. 47, 54-56)
- [4] **KIRCHMAIER, Stephan, Kiyoshi NARUSE, Joachim WITTBRODT a Felix LOOSLI. The Genomic and Genetic Toolbox of the Teleost Medaka (*Oryzias latipes*). *Genetics*. 2015, **199**(4), 905–918. ISSN 0016-6731, 1943-2631. Dostupné z: doi:[10.1534/genetics.114.173849](https://doi.org/10.1534/genetics.114.173849)
- [5] NARUSE, Kiyoshi, Minoru TANAKA a Hiroyuki TAKEDA, ed. *Medaka: A Model for Organogenesis, Human Disease, and Evolution*. B.m.: Springer Japan, 2011. ISBN 978-4-431-92690-0. (Str. 1-9, 122)
- [6] KIMMEL, C. B., W. W. BALLARD, S. R. KIMMEL, B. ULLMANN a T. F. SCHILLING. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 1995, **203**(3), 253–310. ISSN 1058-8388. Dostupné z: doi:[10.1002/aja.1002030302](https://doi.org/10.1002/aja.1002030302)
- [7] FARRELL, Jeffrey A., Yiqun WANG, Samantha J. RIESENFELD, Karthik SHEKHAR, Aviv REGEV a Alexander F. SCHIER. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Science*. 2018, **360**(6392), eaar3131. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:[10.1126/science.aar3131](https://doi.org/10.1126/science.aar3131)
- [8] WAGNER, Daniel E., Caleb WEINREB, Zach M. COLLINS, James A. BRIGGS, Sean G. MEGASON a Allon M. KLEIN. Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo. *Science*. 2018, **360**(6392), 981–987. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:[10.1126/science.aar4362](https://doi.org/10.1126/science.aar4362)
- [9] IWAMATSU, Takashi. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development*. 2004, **121**(7–8), 605–618. ISSN 0925-4773. Dostupné z: doi:[10.1016/j.mod.2004.03.012](https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.012)
- [10] FARNSWORTH, Dylan R., Lauren M. SAUNDERS a Adam C. MILLER. A single-cell transcriptome atlas for zebrafish development. *Developmental Biology*. 2019. ISSN 0012-1606. Dostupné z: doi:[10.1016/j.ydbio.2019.11.008](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.11.008)
- [11] PENNISI, Elizabeth. Development cell by cell. *Science*. 2018, **362**(6421), 1344–1345. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:[10.1126/science.362.6421.1344](https://doi.org/10.1126/science.362.6421.1344)
- [12] **GALLOWAY, Jenna L a Leonard I ZON. 3 Ontogeny of hematopoiesis: Examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. In: *Current Topics in Developmental Biology*. B.m.: Elsevier, 2003, s. 139–158. ISBN 978-0-12-153153-9. Dostupné z: doi:[10.1016/S0070-2153\(03\)53004-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(03)53004-6)

- [13] **OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993, **81**(11), 2844–2853. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:[10.1182/blood.V81.11.2844.bloodjournal81112844](https://doi.org/10.1182/blood.V81.11.2844.bloodjournal81112844)
- [14] WOLF, Anja, Julian AGGIO, Clyde CAMPBELL, Francis WRIGHT, Gabriel MARQUEZ, David TRAVER a David L. STACHURA. Zebrafish Caudal Haematopoietic Embryonic Stromal Tissue (CHEST) Cells Support Haematopoiesis. *Scientific Reports* . 2017, **7**, 44644. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:[10.1038/srep44644](https://doi.org/10.1038/srep44644)
- [15] STACHURA, David L., Jason R. REYES, Petr BARTUNEK, Barry H. PAW, Leonard I. ZON a David TRAVER. Zebrafish kidney stromal cell lines support multilineage hematopoiesis. *Blood*. 2009, **114**(2), 279–289. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:[10.1182/blood-2009-02-203638](https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203638)
- [16] SENDER, Ron, Shai FUCHS a Ron MILO. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*. 2016, **14**(8), e1002533. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:[10.1371/journal.pbio.1002533](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533)
- [17] MILO, Ron, Rob PHILLIPS a Nigel ORME. *Cell biology by the numbers*. New York, NY Abingdon: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2016. ISBN 978-0-8153-4537-4. (Str. 330-332)
- [18] **ORKIN, Stuart H. a Leonard I. ZON. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008, **132**(4), 631–644. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:[10.1016/j.cell.2008.01.025](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025)
- [19] **STACHURA, D. L. a D. TRAVER. Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. *Methods in Cell Biology*. 2016, **133**, 11–53. ISSN 0091-679X. Dostupné z: doi:[10.1016/bs.mcb.2016.03.022](https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.03.022)
- [20] DETRICH, H. W., M. W. KIERAN, F. Y. CHAN, L. M. BARONE, K. YEE, J. A. RUNDSTADLER, S. PRATT, D. RANSOM a L. I. ZON. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* . 1995, **92**(23), 10713–10717. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.92.23.10713](https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10713)
- [21] MORIYAMA, Akemi, Keiji INOHAYA, Kouichi MARUYAMA a Akira KUDO. Bef medaka mutant reveals the essential role of c-myb in both primitive and definitive hematopoiesis. *Developmental Biology*. 2010, **345**(2), 133–143. ISSN 0012-1606. Dostupné z: doi:[10.1016/j.ydbio.2010.06.031](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.06.031)
- [22] HERBOMEL, P., B. THISSE a C. THISSE. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development*. 1999, **126**(17), 3735–3745. ISSN 0950-1991, 1477-9129. Dostupné z: <https://dev.biologists.org/content/126/17/3735>
- [23] MURAYAMA, Emi, Karima KISSA, Agustin ZAPATA, Elodie MORDELET, Valérie BRIOLAT, Hui-Feng LIN, Robert I. HANDIN a Philippe HERBOMEL. Tracing Hematopoietic Precursor Migration to Successive Hematopoietic Organs during Zebrafish Development. *Immunity*. 2006, **25**(6), 963–975. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:[10.1016/j.immuni.2006.10.015](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.015)
- [24] JIN, Hao, Jin XU a Zilong WEN. Migratory path of definitive hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish development. *Blood*. 2007, **109**(12), 5208–5214. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:[10.1182/blood-2007-01-069005](https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-069005)

- [25] BERTRAND, Julien Y, Albert D KIM, Shutian TENG a David TRAVER. CD41+ c-myb+ precursors colonize the zebrafish pronephros by a novel migration route to initiate adult hematopoiesis. *Development (Cambridge, England)*. 2008, **135**(10), 1853–1862. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:[10.1242/dev.015297](https://doi.org/10.1242/dev.015297)
- [26] KISSA, Karima, Emi MURAYAMA, Agustin ZAPATA, Alfonso CORTÉS, Emmanuelle PERRET, Christophe MACHU a Philippe HERBOMEL. Live imaging of emerging hematopoietic stem cells and early thymus colonization. *Blood*. 2008, **111**(3), 1147–1156. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:[10.1182/blood-2007-07-099499](https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099499)
- [27] FLEISCHMAN, Roger A., R.Philip CUSTER a Beatrice MINTZ. Totipotent hematopoietic stem cells: Normal self-renewal and differentiation after transplantation between mouse fetuses. *Cell*. 1982, **30**(2), 351–359. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:[10.1016/0092-8674\(82\)90233-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90233-1)
- [28] TRAVER, David, Alissa WINZELER, Howard M. STERN, Elizabeth A. MAYHALL, David M. LANGENAU, Jeffrey L. KUTOK, A. Thomas LOOK a Leonard I. ZON. Effects of lethal irradiation in zebrafish and rescue by hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2004, **104**(5), 1298–1305. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:[10.1182/blood-2004-01-0100](https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0100)
- [29] BHATTACHARYA, Deepta, Derrick J. ROSSI, David BRYDER a Irving L. WEISSMAN. Purified hematopoietic stem cell engraftment of rare niches corrects severe lymphoid deficiencies without host conditioning. *Journal of Experimental Medicine*. 2006, **203**(1), 73–85. ISSN 0022-1007, 1540-9538. Dostupné z: doi:[10.1084/jem.20051714](https://doi.org/10.1084/jem.20051714)
- [30] KWARTENG, Edward O. a Krista M. HEINONEN. Competitive Transplants to Evaluate Hematopoietic Stem Cell Fitness. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* . 2016, (114) [vid. 2019-10-30]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:[10.3791/54345](https://doi.org/10.3791/54345)
- [31] MURPHY, Kenneth a Casey WEAVER. *Janeway's Immunobiology*. 9th edition. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2017. ISBN 978-0-8153-4505-3. (Str. 643-647)
- [32] **FISCHER, Uwe, Erling Olaf KOPPANG a Teruyuki NAKANISHI. Teleost T and NK cell immunity. *Fish & Shellfish Immunology*. 2013, **35**(2), 197–206. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:[10.1016/j.fsi.2013.04.018](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.018)
- [33] SARDER, Md. Rafiqul Islam, Uwe FISCHER, Johannes Martinus DIJKSTRA, Ikunari KIRYU, Yasutoshi YOSHIURA, Teruo AZUMA, Bernd KÖLLNER a Mitsuru OTOTAKE. The MHC class I linkage group is a major determinant in the in vivo rejection of allogeneic erythrocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* . 2003, **55**(5), 315–324. ISSN 1432-1211. Dostupné z: doi:[10.1007/s00251-003-0587-4](https://doi.org/10.1007/s00251-003-0587-4)
- [34] STAAL, Frank J. T., Herman P. SPAINK a Willem E. FIBBE. Visualizing Human Hematopoietic Stem Cell Trafficking In Vivo Using a Zebrafish Xenograft Model. *Stem Cells and Development*. 2015, **25**(4), 360–365. ISSN 1557-8534. Dostupné z: doi:[10.1089/scd.2015.0195](https://doi.org/10.1089/scd.2015.0195)
- [35] HAMILTON, Noémie, Ian SABROE a Stephen A. RENSHAW. A method for transplantation of human HSCs into zebrafish, to replace humanised murine transplantation models. *F1000Research*. 2018, **7**, 594. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:[10.12688/f1000research.14507.2](https://doi.org/10.12688/f1000research.14507.2)
- [36] TANG, Qin, Nouran S. ABDELFATTAH, Jessica S. BLACKBURN, John C. MOORE, Sarah A. MARTINEZ, Finola E. MOORE, Riadh LOBBARDI, Inês M. TENENTE, Myron S.

- IGNATIUS, Jason N. BERMAN, Robert S. LIWSKI, Yariv HOUVRAS a David M. LANGENAU. Optimized cell transplantation using adult rag2 mutant zebrafish. *Nature Methods* . 2014, **11**(8), 821–824. ISSN 1548-7105. Dostupné z: [doi:10.1038/nmeth.3031](https://doi.org/10.1038/nmeth.3031)
- [37] HESS, Isabell a Thomas BOEHM. Intravital Imaging of Thymopoiesis Reveals Dynamic Lympho-Epithelial Interactions. *Immunity* . 2012, **36**(2), 298–309. ISSN 1074-7613. Dostupné z: [doi:10.1016/j.immuni.2011.12.016](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.016)
- [38] LAWRENCE, Christian, Isaac ADATTO, Jason BEST, Althea JAMES a Kara MALONEY. Generation time of zebrafish (*Danio rerio*) and medakas (*Oryzias latipes*) housed in the same aquaculture facility. *Lab Animal*. 2012, **41**(6), 158–165. ISSN 1548-4475. Dostupné z: [doi:10.1038/labon0612-158](https://doi.org/10.1038/labon0612-158)
- [39] CABEZAS-SAINZ, Pablo, Jorge GUERRA-VARELA, María J. CARREIRA, Javier MARISCAL, María ROEL, Juan A. RUBIOLLO, Andrés A. SCIARA, Miguel ABAL, Luis M. BOTANA, Rafael LÓPEZ a Laura SÁNCHEZ. Improving zebrafish embryo xenotransplantation conditions by increasing incubation temperature and establishing a proliferation index with ZFtool. *BMC Cancer*. 2018, **18**(1), 3. ISSN 1471-2407. Dostupné z: [doi:10.1186/s12885-017-3919-8](https://doi.org/10.1186/s12885-017-3919-8)
- [40] PARICHY, David M. a John H. POSTLETHWAIT. Chapter 1 - The biotic and abiotic environment of zebrafish. In: Robert T. GERLAI, ed. *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish*. B.m.: Academic Press, 2020, s. 3–16. ISBN 978-0-12-817528-6. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-817528-6.00001-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817528-6.00001-2)
- [41] SAMPETREAN, Oltea, Shin-ichi IIDA, Shinji MAKINO, Yuriko MATSUZAKI, Kikuo OHNO a Hideyuki SAYA. Reversible whole-organism cell cycle arrest in a living vertebrate. *Cell Cycle*. 2009, **8**(4), 620–627. ISSN 1538-4101. Dostupné z: [doi:10.4161/cc.8.4.7785](https://doi.org/10.4161/cc.8.4.7785)
- [42] KELLER, Philipp J., Annette D. SCHMIDT, Joachim WITTBRODT a Ernst H. K. STELZER. Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science*. 2008, **322**(5904), 1065–1069. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: [doi:10.1126/science.1162493](https://doi.org/10.1126/science.1162493)
- [43] **CANNOODT, Robrecht, Wouter SAELENS a Yvan SAEYS. Computational methods for trajectory inference from single-cell transcriptomics. *European Journal of Immunology* . 2016, **46**(11), 2496–2506. ISSN 1521-4141. Dostupné z: [doi:10.1002/eji.201646347](https://doi.org/10.1002/eji.201646347)
- [44] BERTRAND, Julien Y., Albert D. KIM, Emily P. VIOLETTE, David L. STACHURA, Jennifer L. CISSON a David TRAVER. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*. 2007, **134**(23), 4147–4156. ISSN 0950-1991. Dostupné z: [doi:10.1242/dev.012385](https://doi.org/10.1242/dev.012385)
- [45] PAN, Y. Albert, Tom FREUNDLICH, Tamily A. WEISSMAN, David SCHOPPIK, X. Cindy WANG, Steve ZIMMERMAN, Brian CIRUNA, Joshua R. SANES, Jeff W. LICHTMAN a Alexander F. SCHIER. ZebraBow: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*. 2013, **140**(13), 2835–2846. ISSN 1477-9129. Dostupné z: [doi:10.1242/dev.094631](https://doi.org/10.1242/dev.094631)
- [46] SPANJAARD, Bastiaan, Bo HU, Nina MITIC, Pedro OLIVARES-CHAUVET, Sharan JANJUHA, Nikolay NINOV a Jan Philipp JUNKER. Simultaneous lineage tracing and cell-type identification using CRISPR-Cas9-induced genetic scars. *Nature Biotechnology*. 2018, **36**(5), 469–473. ISSN 1546-1696. Dostupné z: [doi:10.1038/nbt.4124](https://doi.org/10.1038/nbt.4124)

- [47] SATIJA, Rahul, Jeffrey A. FARRELL, David GENNERT, Alexander F. SCHIER a Aviv REGEV. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nature Biotechnology*. 2015, **33**(5), 495–502. ISSN 1546-1696. Dostupné z: doi:[10.1038/nbt.3192](https://doi.org/10.1038/nbt.3192)
- [48] MOORE, Finola E., Elaine G. GARCIA, Riadh LOBBARDI, Esha JAIN, Qin TANG, John C. MOORE, Mauricio CORTES, Aleksey MOLODTSOV, Melissa KASHETA, Christina C. LUO, Amaris J. GARCIA, Ravi MYLVAGANAM, Jeffrey A. YODER, Jessica S. BLACKBURN, Ruslan I. SADREYEV, Craig J. CEOL, Trista E. NORTH a David M. LANGENAU. Single-cell transcriptional analysis of normal, aberrant, and malignant hematopoiesis in zebrafish. *Journal of Experimental Medicine*. 2016, jem.20152013. ISSN 0022-1007, 1540-9538. Dostupné z: doi:[10.1084/jem.20152013](https://doi.org/10.1084/jem.20152013)
- [49] LANGENAU, David M., Adolfo A. FERRANDO, David TRAVER, Jeffery L. KUTOK, John-Paul D. HEZEL, John P. KANKI, Leonard I. ZON, A. Thomas LOOK a Nikolaus S. TREDE. In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, **101**(19), 7369–7374. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.0402248101](https://doi.org/10.1073/pnas.0402248101)
- [50] CARMONA, Santiago J., Sarah A. TEICHMANN, Lauren FERREIRA, Iain C. MACAULAY, Michael J. T. STUBBINGTON, Ana CVEJIC a David GFELLER. Single-cell transcriptome analysis of fish immune cells provides insight into the evolution of vertebrate immune cell types. *Genome Research*. 2017, **27**(3), 451–461. ISSN 1088-9051, 1549-5469. Dostupné z: doi:[10.1101/gr.207704.116](https://doi.org/10.1101/gr.207704.116)
- [51] ELLETT, Felix, Luke PASE, John W. HAYMAN, Alex ANDRIANOPOULOS a Graham J. LIESCHKE. mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood*. 2011, **117**(4), e49–e56. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:[10.1182/blood-2010-10-314120](https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314120)
- [52] **PAIK, Elizabeth J. a Leonard I. ZON. Hematopoietic development in the zebrafish. *International Journal of Developmental Biology*. 2010, **54**(6–7), 1127–1137. ISSN 0214-6282, 1696-3547. Dostupné z: doi:[10.1387/ijdb.093042ep](https://doi.org/10.1387/ijdb.093042ep)
- [53] THOMPSON, Margaret A., David G. RANSOM, Stephen J. PRATT, Heather MACLENNAN, Mark W. KIERAN, H. William DETRICH, Brenda VAIL, Tara L. HUBER, Barry PAW, Alison J. BROWNLIE, Andrew C. OATES, Andreas FRITZ, Michael A. GATES, Angel AMORES, Nathan BAHARY, William S. TALBOT, Helen HER, David R. BEIER, John H. POSTLETHWAIT a Leonard I. ZON. The cloche and spadetail Genes Differentially Affect Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Developmental Biology*. 1998, **197**(2), 248–269. ISSN 0012-1606. Dostupné z: doi:[10.1006/dbio.1998.8887](https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8887)
- [54] NORTH, Trista E., Wolfram GOESSLING, Carl R. WALKLEY, Claudia LENGERKE, Kamden R. KOPANI, Allegra M. LORD, Gerhard J. WEBER, Teresa V. BOWMAN, Il-Ho JANG, Tilo GROSSER, Garret A. FITZGERALD, George Q. DALEY, Stuart H. ORKIN a Leonard I. ZON. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature*. 2007, **447**(7147), 1007–1011. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:[10.1038/nature05883](https://doi.org/10.1038/nature05883)
- [55] XUE, Yuanyuan, Junhua LV, Chunxia ZHANG, Lu WANG, Dongyuan MA a Feng LIU. The Vascular Niche Regulates Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Lodgment and Expansion via klf6a-ccl25b. *Developmental Cell*. 2017, **42**(4), 349-362.e4. ISSN 1534-5807. Dostupné z: doi:[10.1016/j.devcel.2017.07.012](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.012)
- [56] TAMPLIN, Owen J., Ellen M. DURAND, Logan A. CARR, Sarah J. CHILDS, Elliott J. HAGEDORN, Pulin LI, Amanda D. YZAGUIRRE, Nancy A. SPECK a Leonard I. ZON.

- Hematopoietic Stem Cell Arrival Triggers Dynamic Remodeling of the Perivascular Niche. *Cell*. 2015, **160**(1), 241–252. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:[10.1016/j.cell.2014.12.032](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.032)
- [57] **BAJOGHLI, Baubak, Advaita M. DICK, Annisa CLAASEN, Larissa DOLL a Narges AGHAALLAEI. Zebrafish and Medaka: Two Teleost Models of T-Cell and Thymic Development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(17), 4179. Dostupné z: doi:[10.3390/ijms20174179](https://doi.org/10.3390/ijms20174179)
- [58] BAJOGHLI, Baubak, Paola KURI, Daigo INOUE, Narges AGHAALLAEI, Marleen HANELT, Thomas THUMBERGER, Matteo RAUZI, Joachim WITTBRODT a Maria LEPTIN. Noninvasive In Toto Imaging of the Thymus Reveals Heterogeneous Migratory Behavior of Developing T Cells. *The Journal of Immunology* . 2015, **195**(5), 2177–2186. ISSN 0022-1767, 1550-6606. Dostupné z: doi:[10.4049/jimmunol.1500361](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500361)
- [59] SEEMANN, Frauke, Drew Ryan PETERSON, Michael Wai Lun CHIANG a Doris Wai Ting AU. The development of cellular immune defence in marine medaka *Oryzias melastigma*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2017, **199**, Unraveling complexity: from molecules to ecosystems, 81–89. ISSN 1532-0456. Dostupné z: doi:[10.1016/j.cbpc.2017.03.010](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.03.010)
- [60] ZAPATA, A. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Developmental & Comparative Immunology* . 1979, **3**, 55–65. ISSN 0145-305X. Dostupné z: doi:[10.1016/S0145-305X\(79\)80006-3](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(79)80006-3)
- [61] **GERLACH, Gary F. a Rebecca A. WINGERT. Kidney organogenesis in the zebrafish: insights into vertebrate nephrogenesis and regeneration. *WIREs Developmental Biology*. 2013, **2**(5), 559–585. ISSN 1759-7692. Dostupné z: doi:[10.1002/wdev.92](https://doi.org/10.1002/wdev.92)
- [62] ASTUTI, Yuliana, Ashley C. KRAMER, Amanda L. BLAKE, Bruce R. BLAZAR, Jakub TOLAR, Mandy E. TAISTO a Troy C. LUND. A Functional Bioluminescent Zebrafish Screen for Enhancing Hematopoietic Cell Homing. *Stem Cell Reports*. 2017, **8**(1), 177–190. ISSN 2213-6711. Dostupné z: doi:[10.1016/j.stemcr.2016.12.004](https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.12.004)
- [63] LAM, S. H, H. L CHUA, Z GONG, T. J LAM a Y. M SIN. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental & Comparative Immunology*. 2004, **28**(1), 9–28. ISSN 0145-305X. Dostupné z: doi:[10.1016/S0145-305X\(03\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00103-4)
- [64] GHONEUM, M. M. a N. EGAMI. Age related changes in morphology of the thymus of the fish, *Oryzias latipes*. *Experimental Gerontology*. 1982, **17**(1), 33–40. ISSN 0531-5565. Dostupné z: doi:[10.1016/0531-5565\(82\)90006-7](https://doi.org/10.1016/0531-5565(82)90006-7)
- [65] **ZWOLLO, Patty. The humoral immune system of anadromous fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2018, **80**, Aqua species immunity, 24–33. ISSN 0145-305X. Dostupné z: doi:[10.1016/j.dci.2016.12.008](https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.12.008)
- [66] **SALINAS, Irene, Yong-An ZHANG a J. Oriol SUNYER. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011, **35**(12), Special issue on Teleost Fish Immunology, 1346–1365. ISSN 0145-305X. Dostupné z: doi:[10.1016/j.dci.2011.11.009](https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.009)
- [67] FORN-CUNÍ, G., M. VARELA, P. PEREIRO, B. NOVOA a A. FIGUERAS. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. *Scientific Reports* . 2017, **7**(1), 1–9. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:[10.1038/srep41905](https://doi.org/10.1038/srep41905)

- [68] STEIN, Cornelia, Mario CACCAMO, Gavin LAIRD a Maria LEPTIN. Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biology*. 2007, **8**(11), R251. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:[10.1186/gb-2007-8-11-r251](https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-11-r251)
- [69] NIETHAMMER, Philipp, Clemens GRABHER, A. Thomas LOOK a Timothy J. MITCHISON. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 2009, **459**(7249), 996–999. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:[10.1038/nature08119](https://doi.org/10.1038/nature08119)
- [70] WITTAMER, Valerie, Julien Y. BERTRAND, Patrick W. GUTSCHOW a David TRAVER. Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish. *Blood*. 2011, **117**(26), 7126–7135. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:[10.1182/blood-2010-11-321448](https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-321448)
- [71] VO, Andy H., Alok SWAROOP, Yang LIU, Zachary G. NORRIS a Jordan A. SHAVIT. Loss of Fibrinogen in Zebrafish Results in Symptoms Consistent with Human Hypofibrinogenemia. *PLoS ONE*. 2013, **8**(9) [vid. 2020-04-05]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:[10.1371/journal.pone.0074682](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074682)
- [72] WANG, Zhiping, Shicui ZHANG a Guangfeng WANG. Response of complement expression to challenge with lipopolysaccharide in embryos/larvae of zebrafish *Danio rerio*: Acquisition of immunocompetent complement. *Fish & Shellfish Immunology*. 2008, **25**(3), 264–270. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:[10.1016/j.fsi.2008.05.010](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.05.010)
- [73] JAGADEESWARAN, P., J. P. SHEEHAN, F. E. CRAIG a D. TROYER. Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. *British Journal of Haematology*. 1999, **107**(4), 731–738. ISSN 1365-2141. Dostupné z: doi:[10.1046/j.1365-2141.1999.01763.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01763.x)
- [74] SHEN, Yawei, Dan WANG, Jinliang ZHAO a Xiaowu CHEN. Fish red blood cells express immune genes and responses. *Aquaculture and Fisheries*. 2018, **3**(1), 14–21. ISSN 2468-550X. Dostupné z: doi:[10.1016/j.aaf.2018.01.001](https://doi.org/10.1016/j.aaf.2018.01.001)
- [75] NOMBELA, Ivan a Maria del Mar ORTEGA-VILLAIZAN. Nucleated red blood cells: Immune cell mediators of the antiviral response. *PLoS Pathogens*. 2018, **14**(4). ISSN 1553-7366. Dostupné z: doi:[10.1371/journal.ppat.1006910](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006910)
- [76] NGUYEN-CHI, Mai, Béryll LAPLACE-BUILHÉ, Jana TRAVNICKOVA, Patricia LUZ-CRAWFORD, Gautier TEJEDOR, Georges LUTFALLA, Karima KISSA, Christian JORGENSEN a Farida DJOUAD. TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. *Cell Death & Disease*. 2017, **8**(8), e2979. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:[10.1038/cddis.2017.374](https://doi.org/10.1038/cddis.2017.374)
- [77] TOKUNAGA, Yumie, Masamichi SHIROUZU, Ryota SUGAHARA, Yasutoshi YOSHIURA, Ikunari KIRYU, Mitsuru OTOTAKE, Takahiro NAGASAWA, Tomonori SOMAMOTO a Miki NAKAO. Comprehensive validation of T- and B-cell deficiency in rag1-null zebrafish: Implication for the robust innate defense mechanisms of teleosts. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 1–10. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:[10.1038/s41598-017-08000-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-08000-2)
- [78] PETRIE-HANSON, Lora, Claudia HOHN a Larry HANSON. Characterization of rag1 mutant zebrafish leukocytes. *BMC Immunology*. 2009, **10**, 8. ISSN 1471-2172. Dostupné z: doi:[10.1186/1471-2172-10-8](https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-8)
- [79] JIMA, Dereje D., Radhika N. SHAH, Timothy M. ORCUTT, Deepa JOSHI, J. McHugh LAW, Gary W. LITMAN, Nikolaus S. TREDE a Jeffrey A. YODER. Enhanced transcription of complement and coagulation genes in the absence of adaptive immunity. *Molecular*

- immunology*. 2009, **46**(7), 1505–1516. ISSN 0161-5890. Dostupné z: doi:[10.1016/j.molimm.2008.12.021](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.12.021)
- [80] HOHN, Claudia a Lora PETRIE-HANSON. Rag1^{-/-} Mutant Zebrafish Demonstrate Specific Protection following Bacterial Re-Exposure. *PLoS ONE*. 2012, **7**(9) [vid. 2020-04-17]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:[10.1371/journal.pone.0044451](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044451)
- [81] **NAKANISHI, Teruyuki, Hideaki TODA, Yasuhiro SHIBASAKI a Tomonori SOMAMOTO. Cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011, **35**(12), Special issue on Teleost Fish Immunology, 1317–1323. ISSN 0145-305X. Dostupné z: doi:[10.1016/j.dci.2011.03.033](https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.033)
- [82] **YAMAGUCHI, Takuya, Fumio TAKIZAWA, Mitsuru FURIHATA, Veronica SOTO-LAMPE, Johannes M. DIJKSTRA a Uwe FISCHER. Teleost cytotoxic T cells. *Fish & Shellfish Immunology*. 2019, **95**, 422–439. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:[10.1016/j.fsi.2019.10.041](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.041)
- [83] ZHANG, Beibei, Yasuhito SHIMADA, Tomokazu HIROTA, Michiko ARIYOSHI, Junya KUROYANAGI, Yuhei NISHIMURA a Toshio TANAKA. Novel immunologic tolerance of human cancer cell xenotransplants in zebrafish. *Translational Research*. 2016, **170**, 89-98.e3. ISSN 1931-5244. Dostupné z: doi:[10.1016/j.trsl.2015.12.007](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.12.007)
- [84] MONSON, Christopher A. a Kirsten C. SADLER. Inbreeding Depression and Outbreeding Depression Are Evident in Wild-Type Zebrafish Lines. *Zebrafish*. 2010, **7**(2), 189–197. ISSN 1545-8547. Dostupné z: doi:[10.1089/zeb.2009.0648](https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0648)
- [85] SPIVAKOV, Mikhail, Thomas O. AUER, Ravindra PERAVALI, Ian DUNHAM, Dirk DOLLE, Asao FUJIYAMA, Atsushi TOYODA, Tomoyuki AIZU, Yohei MINAKUCHI, Felix LOOSLI, Kiyoshi NARUSE, Ewan BIRNEY a Joachim WITTBRODT. Genomic and Phenotypic Characterization of a Wild Medaka Population: Towards the Establishment of an Isogenic Population Genetic Resource in Fish. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2014, **4**(3), 433–445. ISSN 2160-1836. Dostupné z: doi:[10.1534/g3.113.008722](https://doi.org/10.1534/g3.113.008722)
- [86] HYODO-TAGUCHI, Y. Establishment of inbred strains of the teleost. *Oryzias latipes*, *Zool. Mag. (Tokyo)*. 1980, **89**. Dostupné z: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10011001013/>
- [87] STAFF, Z. Mutation Details Curation of Older Features-Wild Type Line: AB. *ZFIN Historical Data*. 2016. Dostupné z: <https://zfin.org/ZDB-GENO-960809-7>
- [88] HAFFTER, P., M. GRANATO, M. BRAND, M. C. MULLINS, M. HAMMERSCHMIDT, D. A. KANE, J. ODENTHAL, F. J. van EEDEN, Y. J. JIANG, C. P. HEISENBERG, R. N. KELSH, M. FURUTANI-SEIKI, E. VOGELSANG, D. BEUCHLE, U. SCHACH, C. FABIAN a C. NUSSLEIN-VOLHARD. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 1996, **123**(1), 1–36. ISSN 0950-1991, 1477-9129. Dostupné z: <https://dev.biologists.org/content/123/1/1>
- [89] MELLGREN, Eve M. a Stephen L. JOHNSON. A requirement for kit in embryonic zebrafish melanocyte differentiation is revealed by melanoblast delay. *Development Genes and Evolution*. 2004, **214**(10), 493–502. ISSN 1432-041X. Dostupné z: doi:[10.1007/s00427-004-0428-y](https://doi.org/10.1007/s00427-004-0428-y)
- [90] WHITE, Richard Mark, Anna SESSA, Christopher BURKE, Teresa BOWMAN, Jocelyn LEBLANC, Craig CEOL, Caitlin BOURQUE, Michael DOVEY, Wolfram GOESSLING, Caroline Erter BURNS a Leonard I. ZON. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo

- Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*. 2008, **2**(2), 183–189. ISSN 1934-5909. Dostupné z: doi:[10.1016/j.stem.2007.11.002](https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002)
- [91] ANTINUCCI, Paride a Robert HINDGES. A crystal - clear zebrafish for in vivo imaging. *Scientific Reports* . 2016, **6**(1), 1–10. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:[10.1038/srep29490](https://doi.org/10.1038/srep29490)
- [92] SHIMA, Akihiro a Atsuko SHIMADA. Induction of mutations in males of the fish *Oryzias latipes* at a specific locus after γ -irradiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1988, **198**(1), 93–98. ISSN 0027-5107. Dostupné z: doi:[10.1016/0027-5107\(88\)90044-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90044-9)
- [93] FURUTANI-SEIKI, Makoto. A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development*. 2004, **121**(7), 647–658. ISSN 0925-4773. Dostupné z: [doi:10.1016/j.mod.2004.04.016](https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.04.016)
- [94] WAKAMATSU, Yuko, Sergey PRISTYAZHNYUK, Masato KINOSHITA, Minoru TANAKA a Kenjiro OZATO. The see-through medaka: A fish model that is transparent throughout life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, **98**(18), 10046–10050. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.181204298](https://doi.org/10.1073/pnas.181204298)
- [95] WEINSTEIN, B. M., A. F. SCHIER, S. ABDELILAH, J. MALICKI, L. SOLNICA-KREZEL, D. L. STEMPLE, D. Y. STAINIER, F. ZWARTKRUIS, W. DRIEVER a M. C. FISHMAN. Hematopoietic mutations in the zebrafish. *Development (Cambridge, England)*. 1996, **123**, 303–309. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <https://dev.biologists.org/content/123/1/303.long>
- [96] LYONS, Susan E., Nathan D. LAWSON, Lin LEI, Paul E. BENNETT, Brant M. WEINSTEIN a P. Paul LIU. A nonsense mutation in zebrafish *gata1* causes the bloodless phenotype in vlad tepes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, **99**(8), 5454–5459. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.082695299](https://doi.org/10.1073/pnas.082695299)
- [97] TRAVER, David, Barry H. PAW, Kenneth D. POSS, W. Todd PENBERTHY, Shuo LIN a Leonard I. ZON. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nature Immunology*. 2003, **4**(12), 1238–1246. ISSN 1529-2916. Dostupné z: doi:[10.1038/ni1007](https://doi.org/10.1038/ni1007)
- [98] SOZA-RIED, Cristian, Isabell HESS, Nikolai NETUSCHIL, Michael SCHORPP a Thomas BOEHM. Essential role of *c-myb* in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, **107**(40), 17304–17308. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.1004640107](https://doi.org/10.1073/pnas.1004640107)
- [99] HESS, Isabell, Norimasa IWANAMI, Michael SCHORPP a Thomas BOEHM. Zebrafish model for allogeneic hematopoietic cell transplantation not requiring preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, **110**(11), 4327–4332. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.1219847110](https://doi.org/10.1073/pnas.1219847110)
- [100] RAJAN, Vinothkumar, Nicole MELONG, Wing Hing WONG, Benjamin KING, R. Spencer TONG, Nithin MAHAJAN, Daniel GASTON, Troy LUND, David RITTENBERG, Graham DELLAIRE, Clinton J. V. CAMPBELL, Todd DRULEY a Jason N. BERMAN. Humanized zebrafish enhance human hematopoietic stem cell survival and promote acute myeloid leukemia clonal diversity. *Haematologica*. 2019. ISSN 0390-6078, 1592-8721. Dostupné z: doi:[10.3324/haematol.2019.223040](https://doi.org/10.3324/haematol.2019.223040)
- [101] PAUL, Colin D., Alexis DEVINE, Kevin BISHOP, Qing XU, William J. WULFTANGE, Hannah BURR, Kathryn M. DALY, Chaunte LEWIS, Daniel S. GREEN, Jack R.

STAUNTON, Swati CHOKSI, Zheng-Gang LIU, Raman SOOD a Kandice TANNER.
Human macrophages survive and adopt activated genotypes in living zebrafish. *bioRxiv* .
2018, 181685. Dostupné z: doi:[10.1101/181685](https://doi.org/10.1101/181685)

**značí přehledové články