

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Ing. Pavel Abaffy

Úloha oxidu dusnatého během embryonálního hojení a regenerace
The role of nitric oxide during embryonic wound healing and regeneration

Disertační práce

Vedoucí práce: Mgr. Radek Šindelka, Ph.D.

Laboratoř genové exprese

Biotechnologický ústav, AV ČR, v. v. i.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 11.11.2019

Podpis

Pod'akovanie

Ďakujem vedúcemu práce Mgr. Radkovi Šindelkovi, Ph.D. za odborné vedenie mojej práce, členom Laboratória Génovej Expresie za cenné rady nielen v priebehu celého štúdia, ale aj pri písaní tejto práce a všetkým, ktorí sa v nejakej miere pričínili o to, že som mohol zvládnuť dokončiť toto štúdium.

ABSTRAKT

Studium mechanismů, které kontrolují hojení, je velice atraktivní oblastí biologie a medicíny. Hojení ran se obvykle dělí na dva základní typy. Prvním je hojení dospělých jedinců, které je pomalé a končí jizvou. Druhým je hojení embryí, které je velmi rychlé a bez vzniku jizvy. Hojení je složitý proces, který zahrnuje mnoho kroků a je regulován velkým množstvím různých druhů molekul. Jednou z důležitých molekul je oxid dusnatý (NO), jehož funkce je často spojována s regulací zánětu a angiogeneze v průběhu hojení u dospělých jedinců. Tato práce se zabývá popisem úlohy NO v průběhu hojení časných embryí, která ještě nemají vyvinutý imunitní a cévní systém.

Bylo pozorováno, že vysoká koncentrace NO je produkována v průběhu prvních 30 minut po poranění od stádia blastuly po plovoucího pulce. Úlohou NO je hlavně regulace exprese genů, které jsou spojené s odpovědí na stres a souvisejí s buněčným metabolismem. Dopady produkce NO během hojení jsou však pozorovatelné i několik hodin po uzavření rány v námi nově popsané třetí fázi embryonálního hojení. Ve třetí fázi probíhá remodelace poraněné tkáně a NO reguluje expresi a aktivitu matrix metaloproteináz a migraci naivních buněk imunitního systému do místa poranění.

Předkládaná práce ukazuje na nový mechanismus působení NO v procesu embryonálního hojení a poskytuje vodítko pro potenciální novou účinnou léčbu v případech problematicky se nehojících ran.

Klíčová slova: drápatka vodní, oxid dusnatý, hojení, genová exprese, matrix metaloproteinázy, AP-1, leptin

ABSTRACT

The study of the mechanisms that control wound healing is an attention-drawing area within the fields of biology and medicine. Wound healing can be usually defined as two basic types. The first type is adult wound healing, which is slow and results in the scar formation. The second type is referred to as embryonic wound healing, which is in contrast fast and scarless. Wound healing is a complicated process that includes many steps, which are regulated by various types of molecules. One of these important molecules is nitric oxide (NO). Its function is usually connected with the regulation of inflammation and angiogenesis during adult wound healing. However, there is currently no information on its role during embryonic wound healing, where the immune and vascular systems are not yet developed. In this work, we explore and describe the role of the NO during the healing of the early embryos.

The highest concentration of the NO post wounding is produced during the first 30 minutes after injury. This applies to all developmental stages, from the blastula stage all the way to the swimming tadpole stage. The main role of the NO during embryonic wound healing is the regulation of the gene expression that is connected with the stress response and the regulation of cellular metabolism. Additionally, we observed that the effects of NO production are also observable even few hours after the post wound closure, in what we describe as a third phase of the embryonic wound healing. The third phase deals with the specific remodelling of the tissue around the closed wound area. Lastly, we also discovered that NO regulates the expression and activity of the matrix metalloproteinases and the migration of naïve immune cells to the wound site during this phase.

This research describes a previously undescribed mechanism for the role of NO during the process of embryonic wound healing and potentially opens new strategies for the treatment of the problematic non-healing wounds.

Keywords: *Xenopus laevis*, nitric oxide, wound healing, gene expression, matrix metalloproteinases, AP-1, leptin

OBSAH

Zoznam autorských publikácií.....	12
Úvod.....	14
1. Súčasný stav riešenej problematiky.....	15
1.1. Všeobecný popis hojenia.....	15
1.1.1. Hojenie dospelých	15
Hemostáza.....	16
Zápal	17
Proliferácia.....	18
Remodelácia.....	19
1.1.2. Embryonálne hojenie	19
1.2. Signalizácia regulujúca hojenie, nezávislá na transkripcii.....	22
1.2.1. Vápnik	23
1.2.2. Reaktívne formy kyslíka (ROS)	24
1.2.3. ATP.....	24
1.2.4. Plynné transmitery	25
1.2.5. Oxid dusnatý (NO)	26
Úloha NO v regulácii hojenia	27
1.3. Chronické (nehojace sa) rany.....	28
1.4. Podobnosť hojenia s nádorom.....	30
1.4.1. Úloha oxidu dusnatého v nádoroch	31
1.5. Pazúrnatka vodná ako model pre štúdium hojenia a regenerácie	32
2. Ciele práce	34
3. Materiál a metódy.....	35
3.1. Chemikálie a prístroje	35
3.1.1. Chemikálie.....	35
3.1.2. Protilátky	36
3.1.3. Prístroje.....	36
3.1.4. Roztoky.....	36
3.2. Biologický materiál.....	37
3.2.1. Etické prehlásenie.....	37
3.2.2. Pazúrnatka vodná (<i>Xenopus laevis</i>).....	37

3.2.3.	Bunková línia 4T1	37
3.2.4.	Myš domáca (<i>Mus musculus</i>)	38
3.3.	Metódy.....	38
3.3.1.	Farbenie NO.....	38
3.3.2.	Injekcia morfolíno-oligonukleotidov	38
3.3.3.	Chemická inhibícia	39
3.3.4.	Monitorovanie hojenia.....	39
3.3.5.	Izolácia RNA	40
3.3.6.	Sekvenovanie RNA	41
	Príprava sekvenačných knižníc.....	41
	Analýza dát	42
	Vytvorenie skupín génov	43
	Analýza génovej ontológie.....	43
3.3.7.	Kvantitatívna PCR s reverznou transkripciou (RT-qPCR).....	43
3.3.8.	<i>In situ</i> hybridizácia	44
	Príprava sondy pre <i>in situ</i> hybridizáciu.....	44
	<i>In situ</i> hybridizácia.....	45
3.3.9.	Imunohistochemia.....	46
3.3.10.	Značenie neutrofilov pomocou Sudan Black B	46
3.3.11.	RNA-Seq na úrovni jednej bunky (scRNA-Seq).....	46
	Príprava bunkovej suspenzie.....	46
	Príprava sekvenačných knižníc.....	48
	Analýza dát	48
4.	Výsledky.....	51
4.1.	Produkcia NO počas embryonálneho hojenia a regenerácie	51
4.1.1.	Produkcia NO po poranení embryí v ranných štádiách vývoja	51
4.1.2.	Časová produkcia NO po poranení embryí	52
4.2.	Vplyv produkcie NO na efektivitu embryonálneho hojenia a regenerácie	55
4.2.1.	Zmena rýchlosti embryonálneho hojenia po zablokovaní produkcie NO	55
4.2.2.	Vplyv zablokovania produkcie NO na efektivitu regenerácie.....	55
4.3.	Regulácia génovej expresie vplyvom NO v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie.....	58

4.3.1.	Zmeny v génovej expresii v priebehu embryonálneho hojenia po zablokovaní produkcie NO	58
4.3.2.	Zmeny v génovej expresii v priebehu regenerácie po zablokovaní produkcie NO	61
4.4.	Vplyv NO signálnej dráhy na procesy embryonálneho hojenia.....	62
4.5.	Zmeny v štruktúre miesta poranenia v priebehu embryonálneho hojenia vplyvom zablokovania produkcie NO.....	64
4.6.	Vplyv NO na migráciu buniek imunitného systému do miesta poranenia.....	66
4.6.1.	Vplyv NO na migráciu buniek imunitného systému v priebehu embryonálneho hojenia	66
4.6.2.	Vplyv NO na migráciu buniek imunitného systému v priebehu regenerácie.....	68
4.7.	Overenie vzťahu medzi produkciou NO a aktivitou Leptínu počas embryonálneho hojenia.....	68
4.8.	Vplyv NO na expresiu génov reagujúcich na stres	72
4.8.1.	Zmeny v expresii génov reagujúcich na stres počas embryonálneho vývoja.....	72
4.8.2.	Zmeny v expresii génov reagujúcich na stres počas embryonálneho hojenia, regenerácie a rastu nádoru.....	74
4.8.3.	Expresia génov reagujúcich na stres ako univerzálna odpoveď, ktorá negatívne ovplyvňuje výsledky RNA sekvenácie na úrovni jednej bunky.....	76
	Zmeny vo vlastnostiach bunkovej suspenzie po znížení teploty disociácie	78
5.	Diskusia	81
6.	Záver.....	90
7.	Literatúra	93
8.	Prílohy	109
8.1.	Fragment Analyzer Standard Sensitivity RNA analysis kit manuál	109
8.2.	NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module manuál	110
8.3.	NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina manuál.....	112
8.4.	Lexogen Poly(A) RNA Selection Kit manuál.....	116
8.5.	Lexogen SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit manuál	117
8.6.	Lexogen QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina manuál	119
8.7.	QIAGEN Plasmid midi kit manuál	121
8.8.	SureCell WTA 3' Library Prep Kit for the ddSEQ System manuál.....	122
8.9.	Fragment Analyzer High Sensitivity NGS kit manuál.....	127

Zoznam skratiek

AP	aktivačný proteín
ATP	adenozín 5'-trifosfát
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BSA	bovinný sérový albumín
cGMP	cyklický guanozín 5'-trifosfát
CO	oxid uhoľnatý
COX	cyklooxygenáza
CTF	korigovaná celková fluorescencia
CXCL	chemotaktický ligand zo skupiny chemokínov s motívom C-X-C
DAF-2DA	4,5-diaminofluorescín diacetát
DAP	so smrťou spojený proteín
DEG	diferenciálne exprimovaný gén
DIG	digoxigenín
DMSO	dimetylsulfooxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dpa	dní po amputácii
dpi	dní po injekcii
DUOX	duálna oxidáza
ECM	extracelulárna matrix
EGF	epidermový rastový faktor
EMT	epiteliálno-mezenchymálna tranzícia
eNOS	endoteliálna NO syntáza
FDR	„ <i>False discovery rate</i> “
FGF	fibroblastový rastový faktor
GO	génová ontológia
GSH	redukovaný glutatión
GTP	guanozín 5'-trifosfát
H ₂ S	sulfán
hpa	hodín po amputácii
hpp	hodín po poranení
IL	interleukín
iNOS	induktívna NO syntáza
IP3	inositol-3-fosfát
IP4	inositol-4-fosfát
Itpkb	inositol-3-fosfát 3-kináza B
JNK	c-Jun N-terminálna proteínkináza
KGF	rastový faktor keratinocytov
Lep-R	leptínový receptor
MAPK	mitogénom aktivovaná proteínkináza
MCP	monocytový chemotaktický proteín
MMP	matrix metaloproteináza
MO	morfolino-oligonukleotid
mpa	minút po amputácii
mpp	minút po poranení
n.s.	nesignifikantný
NADPH	redukovaný nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
NAPD+	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát

NBT	nitroblue tetrazolium
NF-κB	nekrotický faktor κB
NK	„ <i>natural killer</i> “
nNOS	neuronálna NO syntáza
NO	oxid dusnatý
NOD-SCID	„ <i>non-obese diabetic/severe combined immunodeficient</i> “
NOS	NO syntáza
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-ón
pa	po amputácii
par.	parentálny
PBS	fosfátový tlmivý roztok
PBS -/-	fosfátový tlmivý roztok bez obsahu iónov Ca ²⁺ a Mg ²⁺
PDE	fosfodiesteráza
PDGF	od krvných doštičiek odvodený rastový faktor
PFA	paraformaldehyd
PI3K	fosfatidylinozitol 3-kináza
PKA	proteínkináza A
PKG	cGMP-závislá proteínkináza
PLC	fosfolipáza C
pp	po poranení
qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia
RFU	relatívna fluorescencná jednotka
RNA	ribonukleová kyselina
RNA-Seq	sekvenovanie RNA
ROS	reaktívne formy kyslíka
RT-qPCR	kvantitatívna PCR s reverznou transkripciou
scRNA-Seq	RNA-Seq na úrovni jednej bunky
SD	štandardná odchýkla
sGC	solubilná guanylát cykláza
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamín
SOD	superoxid dismutáza
TGF	transformujúci rastový faktor
TGFβRI	receptor pre transformujúci rastový faktor β
TIMP	tkanivový inhibítor matrix metaloproteináz
TNF	tumor nekrotizujúci faktor
TRIM	1-[2-(Trifluorometyl)fenyl]imidazol
uPA	urokináza
VASP	fosfoprotein stimulujúci vazodilatáciu
VEGF	cievny endotelový rastový faktor

Zoznam autorských publikácií

Abaffy P., Tomankova S., Naraine R., Kubista M., Sindelka R. **The role of nitric oxide during embryonic wound healing.** *BMC Genomics*. 2019

Dizertačná práca je postavená predovšetkým na mojom prvoautorskom článku. V tomto článku sme študovali úlohu NO v priebehu embryonálneho hojenia.

Tomankova S., **Abaffy P.**, Sindelka R. **The role of nitric oxide during embryonic epidermis development of *Xenopus laevis*.** *Biology Open*. 2017

V tomto článku sme študovali úlohu NO v priebehu vývoja embryonálnej pokožky. Súčasťou tejto práce bola analýza úlohy NO na zmenu génovej expresie v priebehu embryonálneho vývoja. Tieto výsledky sú súčasťou dizertačnej práce.

Sidova M., Tomankova S., **Abaffy P.**, Kubista M., Sindelka R. **Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality.** *Biomolecular Detection and Quantification*, 2015

Súčasťou dizertačnej práce je analýza génovej expresie použitím RNA-Seq a RT-qPCR. Kvalita RNA je dôležitá pre tieto typy analýz. V tomto článku sme sledovali degradáciu RNA. Tieto poznatky boli nevyhnuté pre experimenty v dizertačnej práci.

Sindelka R., **Abaffy P.**, Qu Y., Tomankova S., Sidova M., Naraine R., Kolar M., Peuchen E., Sun L., Dovichi N., Kubista M. **Asymmetric distribution of biomolecules of maternal origin in the *Xenopus laevis* egg and their impact on the developmental plan.** *Scientific Reports*. 2018

V rámci dizertačnej práce som analyzoval zmeny v génovej expresii s využitím RNA-Seq. V tomto článku sme sledovali asymetrickú distribúciu RNA vo vajíčku pazúrnatky vodnej. Metodické poznatky získané v priebehu tohto článku boli dôležité pre analýzu RNA-Seq dát pre dizertačnú prácu.

Naraine R.[†], **Abaffy P.**[†], Valihrachova M., Tomankova S., Pocherniaieva K., Smolik O., Kubista M., Psenicka M., Sindelka R. **NormQ: RNASeq normalization based on RT-qPCR derived size factors.** (under review)

Pri analýze distribúcie RNA v rámci vajíčka sme zistili, že štandardné metódy normalizácie sa nedajú použiť na vzorky, kde nie je väčšina génov rovnomerne zastúpená medzi vzorkami. V tomto článku sme vytvorili novú metódu na normalizáciu RNA-Seq pomocou výsledkov z RT-qPCR. Túto metódu je možné aplikovať aj na iné vzorky a značne zvýšiť kvalitu získaných RNA sekvenačných dát.

† - zdieľané prvoautorstvo

Abaffy P., Lettlova S., Truksa J., Kubista M., Sindelka R. Optimization of protocol for preparation of single-cell suspension from mouse breast cancer with preservation of information of original cell state and cell type composition. 2019 (under review), <https://doi.org/10.1101/824714>

Tento článok sa zameriava na optimalizáciu protokolu pre prípravu bunečnej suspenzie pre single-cell RNA-Seq analýzy. V priebehu disociácie tkaniva je aktivovaná expresia génov reagujúcich na stres, ktoré sa objavujú aj v priebehu hojenia. Táto expresia je nežiadúca pre analýzu génovej expresie na úrovni jednej bunky v priebehu hojenia a regenerácie, ako aj v priebehu rastu nádoru. Výsledky sú dôležité pre ďalšie analýzy v pokračovaní tohto projektu a sú súčasťou dizertačnej práce.

Úvod

Otázka hojenia fascinuje ľudí už od nepamäti. V minulosti viedlo i jednoduché poranenie k mnohým komplikáciám, kedy sa do rany dostali nečistoty a to v najhorších prípadoch viedlo až k smrti. Od vtedy sa medicína posunula ďalej a dnes je jej cieľom dosiahnuť ako úplnú regeneráciu poškodených orgánov a stratených končatín, tak aj zabezpečiť hojenie rán bez vzniku nevkusnej jazvy.

Mechanizmus hojenia je viac-menej univerzálny medzi rôznymi modelovými organizmami a výsledky získané zo štúdie hojenia u živočíchov sa úspešne aplikujú v humánnej medicíne. Jednou z dôležitých molekúl, ktorá sa objavuje v priebehu hojenia je oxid dusnatý (NO). U cicavcov, aplikácia donorov NO na miesto rany viedla nie len ku naštartovaniu hojenia chronických nehojacich sa diabetických rán, ale dokonca aj ku zrýchleniu hojenia normálnych rán. Úloha NO v hojení sa spája s reguláciou rastu ciev v rane (angiogenéza) a lákaním (chemoatrakcia) buniek imunitného systému do rany. Prekvapivé je, že NO je produkovaný aj v embryách, ktoré ešte nemajú vyvinutý ani cievny ani imunitný systém. To naznačuje, že NO má viac funkcií v priebehu hojenia a reguluje aj ďalšie procesy, ktoré zatiaľ neboli popísané.

V tejto práci sme študovali úlohu NO v priebehu hojenia embryí pazúrnatky vodnej (*Xenopus laevis*), ktorá patrí medzi ideálny model podobných štúdií. Hojenie bolo študované ako na molekulárnej, tak aj na bunkovej úrovni. Práca je zameraná na popis časovej regulácie NO v priebehu hojenia a popis procesov, ktoré sú ovplyvnené NO. Navyše, prinášajú nový náhľad na prepojenie medzi úlohou NO a chronickými ranami.

Pre ďalšie porozumenie molekulárnych mechanizmov regulácie hojenia je dôležité porozumieť funkcii a spolupráci jednotlivých buniek. Momentálne najefektívnejším nástrojom je sekvenovanie RNA na úrovni jednej bunky. Avšak, príprava bunkovej suspenzie prináša so sebou technické komplikácie a táto práca sa zameriava aj na optimalizáciu tohto procesu.

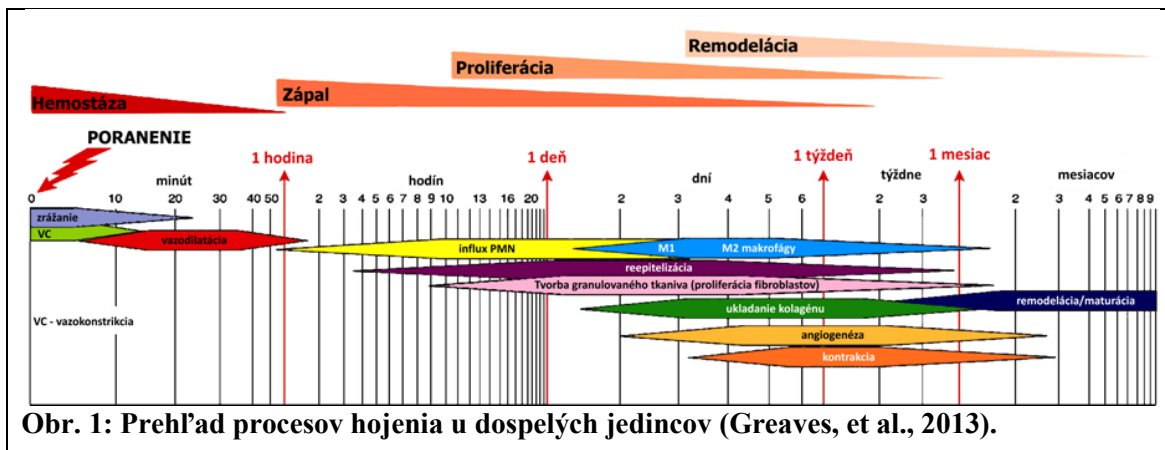
1. Súčasný stav riešenej problematiky

1.1. Všeobecný popis hojenia

Prežitie akéhokoľvek živého jedinca je kriticky závislé na schopnosti opraviť poškodenie (zahojiť ho) vznikajúce rôznymi spôsobmi. Schopnosť hojenia je študovaná u mnohých modelov od jednoduchých organizmov, ako sú baktérie (Hambleton, 1971), kvasinky (Levin, 2005) a prvoky (Szubinska, 1971), cez zložitejšie organizmy ako sú rastliny (Volkman & Baluska, 1999) a nižšie živočíchy (Belacortu & Paricio, 2011), až po najzložitejšie organizmy, ako sú vyššie živočíchy a človek (Zomer & Trentin, 2018). Rovnako sú tieto procesy študované na úrovni poškodenia jednej bunky, kde model predstavuje zárodočná bunka/vajíčko (Simon, et al., 2013), cez viacbunkové systémy (Li, et al., 2013), až po komplexný proces regenerácie tkaniva (Love, et al., 2013). Nezávisí to od toho, aký jednoduchý, alebo zložitý systém je, hojenie je vždy výsledok postupnosti krokov, kedy každý krok posúva poškodenie bližšie k oprave a obnoveniu pôvodnej štruktúry a funkcie (Sonnemann & Bement, 2011). Mechanizmy hojenia môžeme rozdeliť do dvoch hlavných kategórií: hojenie dospelých jedincov, ktoré zvyčajne končí vznikom jazvy; a embryonálne hojenie, ktoré je omnoho jednoduchšie a rýchlejšie ako hojenie dospelých a na jeho konci nevzniká jazva (Larson, et al., 2010).

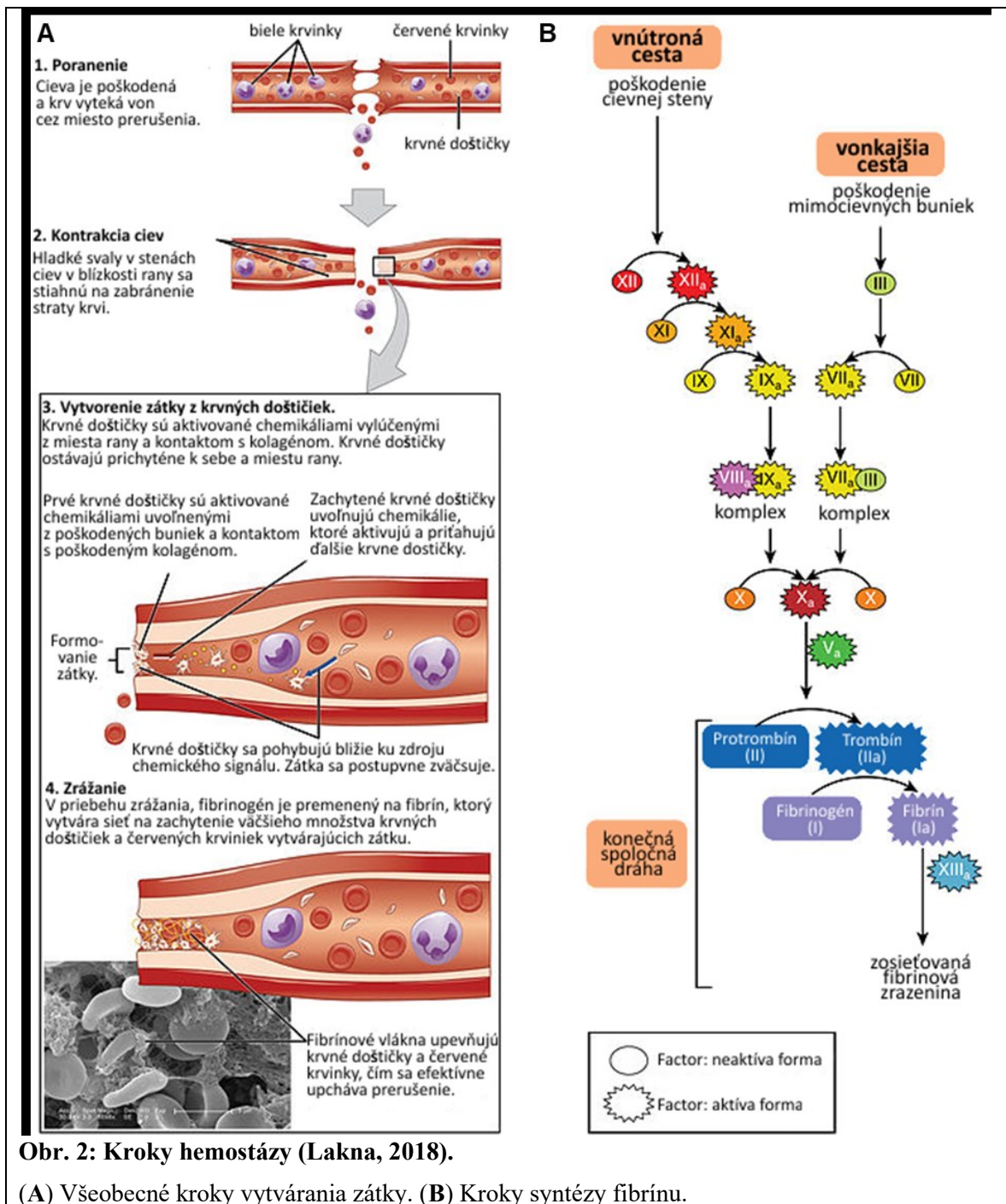
1.1.1. Hojenie dospelých

Hojenie dospelých jedincov sa zvyčajne delí na 4 základné fázy: hemostáza, zápal, proliferácia a remodelácia (**Obr. 1**). Tieto štyri procesy nie sú od seba striktne oddelené a prelínajú sa (Sonnemann & Bement, 2011). Sú regulované veľkým množstvom molekúl, vrátane transkripčných faktorov (Schafer & Werner, 2007), proteáz (McCarty & Percival, 2013), rastových faktorov (Yamakawa & Hayashida, 2019) a signálnych peptidov (Barrientos, et al., 2008; Ridiandries, et al., 2018). Prerušenie, alebo predĺženie niektorej z fáz hojenia môže viesť k spomaleniu alebo až zastaveniu hojenia a vzniku chronickej nehojacej sa rany (Qing, 2017). Hojenie ľudí býva častokrát ovplyvnené mnohými exogénnymi faktormi, ako je napr. fajčenie, alebo chorobami, ako je cukrovka, podvýživa, alebo obezita.



Hemostáza

Hemostáza začína ihneď po poranení a trvá desiatky minút. Cieľom je obmedziť stratu krvi a zabrániť vniknutiu cudzorodých patogénov do prostredia rany. To sa dosahuje tromi procesmi: kontrakcia/zúženie ciev v mieste poranenia (vazokonstrikcia), vytvorenie dočasnej zátky z krvných doštičiek a zrážanie krvi v mieste poškodenia (**Obr. 2A**) (Greaves, et al., 2013). Vazokonstrikcia je zabezpečená bunkami hladkej svaloviny ciev pôsobením tromboxánu a prostaglandínov (Biaggioni, et al., 1989). Krvné doštičky sa viažu na kolagén a vytvára sa primárna zátka (Savage, et al., 1996). Zrážanie krvi je dosiahnuté kaskádou enzymatických reakcií, ktoré zahŕňajú niekoľko faktorov. Tie sa premieňajú hydrolyzou na aktívne proteázy. Zrážanie krvi môže byť aktivované dvomi cestami (**Obr. 2B**). Vnútorňa dráha sa spúšťa v momente, keď krv prichádza do kontaktu s cudzorodým povrchom, zatiaľ čo vonkajšia dráha sa spúšťa v momente, keď krv prichádza do kontaktu s poškodeným tkanivom. Obe cesty končia aktivovaním faktoru X na Xa. Následne faktor Xa premieňa protrombín na trombín. Táto premena je urýchlená faktorom Va. Trombín potom premieňa fibrinogén na fibrín. Na záver, fibrín polymerizuje a vytvára vlákna, ktoré zachytávajú ďalšie krvné bunky (Chu, 2011; Blanco & Blanco, 2017). V momente, keď je zátka vytvorená a krvácanie je zastavené, tak zátka a okolité tkanivo rany začína produkovať cytokíny podporujúce zápal, ako sú napr. CXCL8, CXCL1 a CXCL2 (Ridiandries, et al., 2018) a rastové faktory ako sú TGF- β , PDGF, FGF a EGF. To vedie k naštartovaniu migrácie buniek imunitného systému a začatiu fázy zápalu (Ridiandries, et al., 2018).



Zápal

Pre fázu zápalu je charakteristické hromadenie sa buniek zápalu v rane a zvýšené množstvo molekúl podporujúcich angiogénu. Fáza zápalu trvá niekoľko hodín až niekoľko dní. Počas tejto fázy, bunky zápalu odstraňujú mŕtve bunky, nečistoty a iné cudzorodé častice z rany. Bunky zápalu tiež aktivujú uvoľňovanie molekúl zabezpečujúcich migráciu, proliferáciu a diferenciáciu endotelových buniek, endotelových progenitorových buniek a keratinocytov (Greaves, et al., 2013).

Medzi prvými bunkami, ktoré sa objavujú v rane sú polymorfonukleárne biele krvinky (neutrofilly) (Briggaman, et al., 1984). Neutrofilly bránia infekcii v rane pomocou fagocytózy cudzorodých patogénov, alebo ich odstránením pomocou produkcie reaktívnych foriem kyslíka („reactive oxygen species“, ROS) a proteáz (Dovi, et al., 2004). Neutrofilly, okrem čistenia rany, regulujú aj zápal a produkujú rastové faktory a cytokíny ako sú TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL8, CXCL2 a MCP-1 (Gillitzer & Goebeler, 2001). Taktiež exprimujú gény pre reguláciu angiogenézy (VEGF, CXCL3 a MCP-1), proliferáciu fibroblastov a keratinocytov (IL-8, IL-1 β a MCP-1), adhéziu keratinocytov na pokožku (laminín) a remodeláciu tkaniva (uPA) (Wilgus, et al., 2013). V ďalšej fáze klesá počet neutrofilov a zvyšuje sa množstvo makrofágov. Tie fagocytózou odstraňujú okrem bunkových pozostatkov a baktérii aj ostávajúce neutrofilly (Koh & DiPietro, 2011). Táto činnosť je špecifická pre M1 formu makrofágov (Krzyszczuk, et al., 2018). M1 makrofágy môžu diferencovať na M2 makrofágy vplyvom mikroprostredia rany (Martinez & Gordon, 2014). Táto premena je indukovaná glukokortikoidmi, IL-10, prostaglandínmi, IL-4/IL-13 a špecifickými toll-like receptormi (Stout, et al., 2005). M2 forma makrofágov je zodpovedná za reparačné a regeneračné mechanizmy (Hesketh, et al., 2017). M2 makrofágy produkujú protizápalové cytokíny, ako je antagonista IL-1 receptora a IL-10, rastové faktory na podpora syntézy extracelulárnej matrix (ECM), angiogenézy a proliferácie fibroblastov, ako sú TGF- β a VEGF (Brancato & Albina, 2011). Aktivita M2 makrofágov je nevyhnutná pre začiatok fázy proliferácie (Hesketh, et al., 2017).

Proliferácia

Táto fáza sa vyznačuje zvýšeným delením buniek, ktoré sú dôležité pre úplné uzavretie rany. Fáza proliferácie sa prekrýva s predchádzajúcou fázou a trvá niekoľko dní až týždňov. V priebehu tejto fázy, delenie buniek a štruktúrnych komponentov je riadené faktormi produkovanými vo fáze zápalu. V priebehu fázy proliferácie dochádza k bunkovému deleniu fibroblastov a endotelových buniek, ich migrácii a aj k zmene ich fenotypu. Súčasne nastáva zmena štruktúry ECM a vytváranie granulačného tkaniva (Greaves, et al., 2013).

Fibroblasty zohrávajú hlavnú úlohu v priebehu proliferácie. Deliace sa fibroblasty produkujú matrixové proteíny ako sú fibronektín, kyselina hyalurónová, kolagén a proteoglykány. Ich produkcia pomáha vytvárať novú ECM, ktorá je dôležitá pre migráciu keratinocytov. Pôvodná fibrínová štruktúra je nahradená novým granulačným tkanivom.

V priebehu formovania granulačného tkaniva prebieha angiogenéza, ktorá je regulovaná faktormi produkovanými fibroblastami a makrofágmi (napr. VEGF, FGF, angiopoetín1 a trombospondín), keratinocytmi (napr. CXCL8 a VEGF) a samotnými endotelovými bunkami (napr. CXCL8 a VEGF). Fibrínové vlákna sú nahradené kolagénom III, ktorý je syntetizovanými fibroblastami a keratinocytmi (Thiruvoth, et al., 2015). V ďalšej fáze sa v rane objavujú myofibroblasty, ktoré vznikajú diferenciaciou fibroblastov, ktorá je spustená pomocou TGF- β a CXCL8. Myofibroblasty zabezpečujú kontrakciu rany. V priebehu vytvárania granulačného tkaniva, keratinocyty migrujú na okraj rany a začínajú reepitelizáciu. Reepitelizácia je spustená pomocou EGF, KGF a TGF- α , ktoré sú produkované krvnými doštičkami, keratinocytmi a M2 makrofágmi (Baltzis, et al., 2014). Po obnovení vrstvy epitelu, keratinocyty a fibroblasty produkujú kolagén IV na vytvorenie bazálnej membrány (Thiruvoth, et al., 2015). Keratinocyty sa delia a obnovujú epidermálnu vrstvu na vytvorenie bariéry proti infekcii.

Remodelácia

Fáza remodelácie je posledná fáza hojenia a môže trvať mesiace až roky (Greaves, et al., 2013). Dôležitým krokom v tejto fáze je remodelácia kolagénu, kedy sa kolagén III nahrádza za kolagén I. Kyselina hyalurónová a glykosaminoglykány sú nahradené za proteoglykány a odstraňuje sa fibronektín. Remodelácia je kontrolovaná ako aktivitou MMP, tak aj aktivitou tkanivových inhibítorov metaloproteináz (TIMP) (Thiruvoth, et al., 2015). Výsledkom remodelácie je vznik jazvy.

1.1.2. Embryonálne hojenie

Porovnanie hojenia dospelých a embryonálneho hojenia vykazuje niekoľko podobností, ako aj odlišností (**Tab. 1**). Najdôležitejším rozdielom medzi hojením embryí a hojením dospelých jedincov je schopnosť embryí hojiť sa bez vzniku jazvy (Larson, et al., 2010). Tento fenomén bol popísaný u rôznych organizmov vrátane embryí cicavcov. U ľudských plodov bola pozorovaná strata schopnosti hojiť tkanivo bez vzniku jazvy až po 24 týždni tehotenstva (Lane, 1986).

Tab. 1: Porovnanie rozdielnych faktorov medzi hojením dospelých jedincov a embryonálnym hojením (Larson, et al., 2010).

	Hojenie dospelých jedincov	Embryonálne hojenie
Kolagén	Dominantný kolagén I	Dominantný kolagén III
Kyselina hyalurónová	Nízka hladina	Vysoká hladina
Modulátory ECM	Nízky pomer MMP k TIMP vedie k akumulácii kolagénu	Vysoký pomer MMP k TIMP
Krvné doštičky	Produkujú PDGF, TGF- β 1 a TGF- β 2	Znížená degranulácia a agregácia
Bunky zápalu	Mnoho	Málo
Interleukíny	IL-6 a IL-8 podporujúce zápal	Protizápalový IL-10
TGF- β	Vysoká hladina TGF- β 1 a TGF- β 2	Nízka hladina TGF- β 1 a TGF- β 2, vysoká hladina TGF- β 1 a TGF- β 3
Génová expresia	Oneskorená expresia génov podporujúcich rast a delenie buniek	Okamžitá expresia génov podporujúcich rast a delenie buniek

V prípade embryonálneho hojenia, po poranení sú spustené signály o poškodení. To spúšťa akumuláciu aktínu a myozínu na okraji rany a formovanie aktíno-myozínového prstenca. Po vytvorení aktíno-myozínovej štruktúry, fagocytujúce bunky ako napr. makrofágy, migrujú do rany na odstránenie apoptotických buniek a nečistôt. Následne, aktínové štruktúry zabezpečujú kontrakciu rany a zmenšenie veľkosti rany. Na záver, lameliopodie a filopodie na aktíno-myozínovom prstenci zabezpečia uzavretie rany spôsobom podobným zipsu (Cordeiro & Jacinto, 2013), čo vedie k reepitelizácii rany.

Najčastejšie diskutovaným rozdielom medzi embryonálnym hojením bez vzniku jazvy a hojením dospelých so vznikom jazvy býva imunitná odpoveď. Embryá ešte nemajú plne vyvinutý imunitný systém a majú celkovo menší počet buniek zápalu, ako sú neutrofilové a makrofágy (Cowin, et al., 1998). Navyše, produkujú vyššie hladiny protizápalových cytokínov, predovšetkým IL-10, čo blokuje migráciu makrofágov a neutrofilov do rany (King, et al., 2014). Úloha buniek zápalu pri vzniku jazvy bola pozorovaná u myši so zablokovanou expresiou hematopoetického transkripčného faktoru PU.1. To viedlo k zníženiu množstva neutrofilov a makrofágov a k hojeniu kože dospelých myši bez vzniku jazvy (Martin, et al., 2003). Podobne, štúdie kde bola umelo stimulovaná imunitná odpoveď u embryí myši viedla k vzniku jazvy (Rolfe & Grobbelaar, 2012). Na druhej strane, aktivita imunitného systému je súčasne dôležitá pre správne hojenie. Napr. zablokovanie makrofágov, viedlo k nedostatočnému hojeniu u králikov (Leibovich & Ross, 1975), alebo k zastaveniu regenerácie u salamandry (Godwin, et al., 2013), alebo dania (Petrie, et al., 2014).

Štruktúra ECM v priebehu hojenia zohráva tiež dôležitý rozdiel v hojení bez vzniku jazvy. Embryonálna rana vykazuje vysokú hladinu kyseliny hyalurónovej (Sawai, et al.,

1997), čo môže byť dôsledkom nízkej aktivity hyaluronidázy v embryách (West, et al., 1997) a vyššou expresiou receptora kyseliny hyalurónovej (CD44) vo fibroblastoch embryí (Alaish, et al., 1994). U embryí bola pozorovaná odlišná syntéza kolagénu, rozdiely boli pozorované v rýchlosti depozície, zmene pomerov kolagénov a množstve kolagénu samotného (Lovvorn, et al., 1999). Štúdie ukázali, že fibroblasty nie len, že produkujú kolagén III, ale nový kolagén sa ukladá v podobnej štruktúre ako v prípade neporanenej pokožky (Carter, et al., 2009). Taktiež pomer MMP k TIMP je u embryí v prospech MMP, čo znamená, že komponenty ECM sú aktívne degradované a prebieha predovšetkým remodelácia, namiesto akumulácie ECM v mieste rany (Dang, et al., 2003).

Hojenie je regulované rôznymi transkripčnými faktormi, ako je napr. AP-1 (Martin & Nobes, 1992). Zvýšená aktivita AP-1 je spájaná s aktiváciou Rho GTPázy, ktorá je zodpovedná za vytváranie aktínového prstenca na okraji embryonálnej rany (Brock, et al., 1996). Síce aktivita AP-1 bola pozorovaná v oboch typoch hojenia, tak zatiaľ čo u dospelých expresia AP-1 pretrvávala dlhšiu dobu, tak v prípade embryonálneho hojenia sa objavuje len krátky čas (Gangnuss, et al., 2004). Taktiež bol pozorovaný rozdiel v expresii rastových faktorov z rodiny TGF- β , ktoré sa objavujú v každom kroku hojenia, ako je proliferácia, diferenciácia, produkcia ECM a modulácia imunitnej odpovede (Gilbert, et al., 2016). Rôzne izoformy (TGF- β 1, 2 a 3) sa viažu na rovnaké receptory (TGF β RI a II) a spúšťajú signalizáciu cez kanonickú, alebo nekanonickú signálnu dráhu. Je jasné, že rôzne izoformy majú rôzne biologické funkcie, vrátane regulácie transkripcie, avšak mechanizmy ich akcie sú zatiaľ stále neznáme. Rozdiel v zastúpení izoform TGF- β medzi hojením dospelých a embryonálnym hojením je presne opačné. V embryách je vysoká hladina TGF- β 3 a nízka hladina TGF- β 1 a 2 (Gilbert, et al., 2016). V embryonálnej rane, TGF- β 3 signalizácia znižuje počet makrofágov a neutrofilov v rane a expresiu kolagénu a fibronektínu (Larson, et al., 2010). Klinické štúdie ukázali, že injekcia TGF- β 3 do rany dospelých jedincov viedla ku zníženiu formovania rany (Ferguson, et al., 2009). Navyše, zablokovanie funkcie TGF- β 1 a TGF- β 2 tiež znížilo formovanie jazvy. Avšak, pokusy zabrániť formovaniu jazvy s cieľom na izoformy TGF- β , ktoré boli úspešné v preklinických testoch skončili neúspešne pri klinickom testovaní (Ferguson, et al., 2009; Khansa, et al., 2016).

Embryonálne hojenie je unikátne, avšak stále nie je detailne pochopené. Ďalšie štúdie sú dôležité pre úspešné aplikovanie v humánnej medicíne pre podporu hojenia bez vzniku jazvy.

1.2. Signalizácia regulujúca hojenie, nezávislá na transkripcii

Hojenie začína okamžite, ako sa objaví poranenie. Preto bezprostredná správa o poškodení je nevyhnutná pre správne fungovanie procesu hojenia a pochopenie jej regulácie môže prispieť k ďalšiemu pokroku v regeneratívnej medicíne. Často študovanou reguláciou sú signálne kaskády zahrňujúce transkripciu. Avšak, génová expresia trvá nejakú dobu a preto sa začali študovať okamžité signály poškodenia, ktoré sú nezávislé na transkripcii. Medzi najčastejšie študované signály regulujúce proces hojenia patria ióny Ca^{2+} , ROS a ATP (Tab. 2). Ich dôležitosť pre proces hojenia bola ukázaná mnohokrát (Cordeiro & Jacinto, 2013). V poslednej dobe sa začína venovať pozornosť aj ďalším malým molekulám, ktoré sa nazývajú plynné transmitery („gasotransmitters“) a ktoré môžu regulovať hojenie (Ahanger, et al., 2011; Takagi, et al., 2016; Liu, et al., 2014; Zhao, et al., 2017).

Tab. 2: Niektoré na transkripcii nezávislé signály poškodenia (Cordeiro & Jacinto, 2013).

Signál	Efekt	Efektor	Typ poškodenia	Modelový systém
Ca^{2+}	Polymerizácia aktínu, vytváranie aktínových vlákien	Neznámy	Mechanické	Monovrstva boviných endotelových buniek rohovky
Ca^{2+}	Neznámy	Neznámy	Mechanické	Bunky epitelu rohovky kráľika
Ca^{2+}	Neznámy	ATP	Mechanické	Kochlea potkana
Ca^{2+}	Polymerizácia aktínu, vytváranie aktínového prstenca	$\text{G}\alpha\text{q}$ -PLC β dráha, CDC42, DAP kináza	Spôsobené laserom, mechanické	Dospelý <i>C.elegans</i>
Ca^{2+}	Pravdepodobne zápal	Pravdepodobne DUOX - H_2O_2	Spôsobené laserom, mechanické	Dospelý <i>C.elegans</i>
Ca^{2+}	Regenerácia	Neznámy	Mechanické prerezanie	Chvostová plutva dospelého a larválneho dania pruhovaného
Ca^{2+}	Polymerizácia aktínu, kontrakcia aktíno-myozínu	RhoA, CDC42	Spôsobené laserom	Vajíčka pazúrnatky vodnej
H_2O_2	Chemoatrakcia bielych krviniek, zápal	NADPH oxidáza, DUOX	Spôsobené laserom	Embryá vínnej mušky
H_2O_2	Regenerácia	Rodina SRC kináz (Fynb, Lyn)	Mechanické prerezanie	Chvostová plutva dospelého a larválneho dania pruhovaného

H ₂ O ₂	Regenerácia	WNT, β-katenín, FGF20	Mechanická amputácia	Chvostík žubrienok pazúrnatky vodnej
ATP	Chemoatrakcia mikroglií	Receptor P2Y	Spôsobené laserom	Mozog dospelých myší
ATP	Migrácia a delenie buniek	Ca ²⁺ , SRC, PI3K, EGF	Mechanické	Ľudské bunky epitelu rohovky a priedušiek

1.2.1. Vápnik

Ióny vápniku Ca²⁺ sú druhý posol, ktorý sa nachádza všade a sú esenciálne pre reguláciu ako bunkového poškodenia (Benink & Bement, 2005), tak aj viacbunkového poranenia (Soto, et al., 2013). Vlna zvýšenia hladiny iónov Ca²⁺ v cytoplazme postupuje v tkanive stovky mikrometrov ihneď po poranení (Soto, et al., 2013; Yoo, et al., 2012). Vďaka tomu umožňujú ióny Ca²⁺ šírenie informácie o poškodení do miest vzdialenejších od poškodenia, čo vo finále umožňuje aktiváciu buniek imunitného systému a kontrakciu okrajov poranenia (Razzell, et al., 2013; Antunes, et al., 2013).

Poranením aktivované zvýšenie hladiny iónov Ca²⁺ v cytoplazme môže byť aktivované poškodením cytoplazmovej membrány, mechanickou/chemickou/elektrickou aktiváciou iónových Ca²⁺ kanálov, alebo ligandom aktivovaným receptorom (napr. receptory rastových faktorov, alebo receptory spriahnuté s G-proteínmi). Napríklad, ATP, ktoré sa uvoľnilo do medzibunkového priestoru po poškodení bunky aktivuje receptor spriahnutý s G-proteínmi na susedných bunkách (Berridge, 1997; Herrgen, et al., 2014). To vedie k produkcii IP₃ a zvýšenie hladiny iónov Ca²⁺ v cytoplazme po aktivácii Ca²⁺-púmp v endoplazmovom retikule. Navyše, otvorenie iónových Ca²⁺ kanálov je aktivované aj pomocou produktu aktivity Itpkb, IP₄ (Soto, et al., 2013). Ióny Ca²⁺ ďalej stimulujú sekréciu ATP, čím sa uzatvára cyklus (Praetorius & Leipziger, 2009). Okrem toho, IP₃ môže prenikať cez štrbinové spojenia („gap junction“), čím tiež podporuje tento „domino efekt“ a ďalšie šírenie vlny signálu iónov Ca²⁺ (Boitano, et al., 1992; Handly & Wollman, 2017). Ióny Ca²⁺ ďalej regulujú aktivitu RhoA a CDC42 v oblasti poranenia, čím regulujú polarizáciu aktínu a vytváranie aktíno-myozínového prstenca v okolí rany (Li, et al., 2013), ktorý slúži na kontrakciu rany. Okrem toho, signál iónov Ca²⁺ sa viaže na „EF-hand“ doménu NADPH-oxidázy DUOX, čím spúšťa produkciu ROS (Razzell, et al., 2013).

1.2.2. Reaktívne formy kyslíka (ROS)

Kyslík (O_2) je esenciálny substrát vyžadovaný pre vysoké výťažky ATP produkovaného v mitochondriách, ktorý v kontexte hojenia, je dôležitý ako zdroj energie potrebnej pre obnovu tkaniva (Dunnill, et al., 2017). Radikálové deriváty O_2 sa spoločne nazývajú reaktívne formy kyslíka. Najznámejší zástupcovia ROS sú: superoxidový anión $\cdot O_2^-$, peroxidový anión $\cdot O_2^{2-}$, peroxid vodíka H_2O_2 , hydroxylový radikál $\cdot OH$ a hydrxylový ión OH^- (Dunnill, et al., 2017). Zatiaľčo nízka koncentrácia ROS (100-250 μM) slúži ako druhý posol vo vnútrobunkovej signalizácii, tak vysoká hladina ROS vedie k oxidačnému stresu, ktorý pokiaľ pretrváva dlhšiu dobu, tak môže dôjsť k narušeniu procesu hojenia (Andre-Levigne, et al., 2017). ROS regulujú hojenie v každej fáze. Na začiatku regulujú vazokonstrikciu a agregáciu krvných doštičiek a následnú chemotaxiu buniek zápalu (Yoo, et al., 2011; Klyubin, et al., 1996; Kuiper, et al., 2011). Ďalej, ROS stimulujú diapedézu bielych krviniek, čo slúži na usmrtenie mikroorganizmov v mieste rany. Vysoké hladiny ROS majú v priebehu hojenia aj antimikrobiálny efekt (Hoffmann & Griffiths, 2018), kedy makrofágy a neutrofily produkujú vysoké hladiny ROS, ktoré sú letálne pre kontaminujúce patogény (Hoffmann & Griffiths, 2018). V tomto čase sú dočasne zablokované mechanizmy znižujúce oxidačný stres ako sú superoxid dismutázy (Cu/ZnSOD, MnSOD, SOD3), peroxidázy (kataláza, fosfolipid hydroperoxid glutatión peroxidáza), peroredoxíny a malé antioxidanty (vitamín E, glutatión) (Fitzmaurice, et al., 2011; Kunkemoeller & Kyriakides, 2017). ROS taktiež podporujú opravu poranenia cez aktiváciu uvoľnenia $TNF-\alpha$ a PDGF. V priebehu fázy proliferácie ROS aktivujú proliferáciu a migráciu fibroblastov a regulujú TGF- β 1 signalizáciu, čo vedie ku produkcii kolagénu a fibronektínu a expresii FGF (Hoffmann & Griffiths, 2018; Levigne, et al., 2016). V priebehu remodelácie, ROS regulujú formovanie ECM a v rovnakom čase proliferáciu a migráciu keratinocytov (Fitzmaurice, et al., 2011; Kunkemoeller & Kyriakides, 2017). Ako vidno, každý krok procesu hojenia je závislý na kontrole redoxného stavu a jemná regulácia produkcie ROS je kritická pre správny a efektívny proces opravy poškodenia.

1.2.3. ATP

Nukleotidy môžu fungovať ako v rámci vnútrobunkovej signalizácie, tak aj v rámci medzibunkovej signalizácie (Cordeiro & Jacinto, 2013). ATP je rozpoznávané predovšetkým purínovými receptormi, ako sú P2 receptory. Tie majú následne rôzne efekty

na proces hojenia. P2 receptory sa delia na ionotropné (P2X), ktoré sú ligand-viažúce iónové kanály a metabotropné (P2Y), ktoré sú receptory spriahnuté s G-proteínmi (Khakh, et al., 2001). Za fyziologických podmienok, hladina vnútrobunkového ATP je veľmi vysoká (okolo 100 mM) a oproti tomu, je hladina mimobunkového ATP veľmi nízka (okolo 10 nM). Poškodenie bunky vedie k zvýšeniu hladiny mimobunkového ATP a aktivácii P2Y receptora, ktorý ďalej reguluje uvoľnenie iónov Ca^{2+} (Handly & Wollman, 2017), ako aj aktiváciu MMP (Han, et al., 2008; Gu & Wiley, 2006; Zhang, et al., 2010). Vnútrobunkový ATP je taktiež dôležitý pre aktiváciu DUOX a produkciu H_2O_2 (van der Vliet & Janssen-Heininger, 2014).

1.2.4. Plynné transmitery

Plynné transmitery sú definované ako malé molekuly plynu, ktoré sú endogénne; sú enzymaticky produkované, pričom ich produkcia je regulovaná; majú špecifické bunkové a molekulové ciele; sú voľne priepustné cez membrány; a majú definovanú fyziologickú funkciu (Wang, 2002). Medzi plynné transmitery patria aktuálne tri molekuly: oxid dusnatý (NO), oxid uhoľnatý (CO) a sulfán (H_2S). Úloha NO bola študovaná dlhšie ako úloha zvyšných dvoch molekúl a venujeme mu samostatnú kapitolu.

CO vzniká po degradácii hému katalyzovanej pomocou hém oxygenáz typu 1 alebo 2 (Rodgers, et al., 1994). CO moduluje cytokíny a aktivuje MAPK (Abraham & Kappas, 2008). Niektoré štúdie ukázali, že donory CO môžu zrýchliť proces hojenia žalúdočných vredov, tým že pomáhajú migrácii buniek cez aktiváciu proteín kinázy C (PKC) (Takagi, et al., 2016). Rovnako, CO-uvolňujúce molekuly („CO-releasing molecules“) boli použité na moduláciu rezného poranenia u myší (Ahanger, et al., 2011).

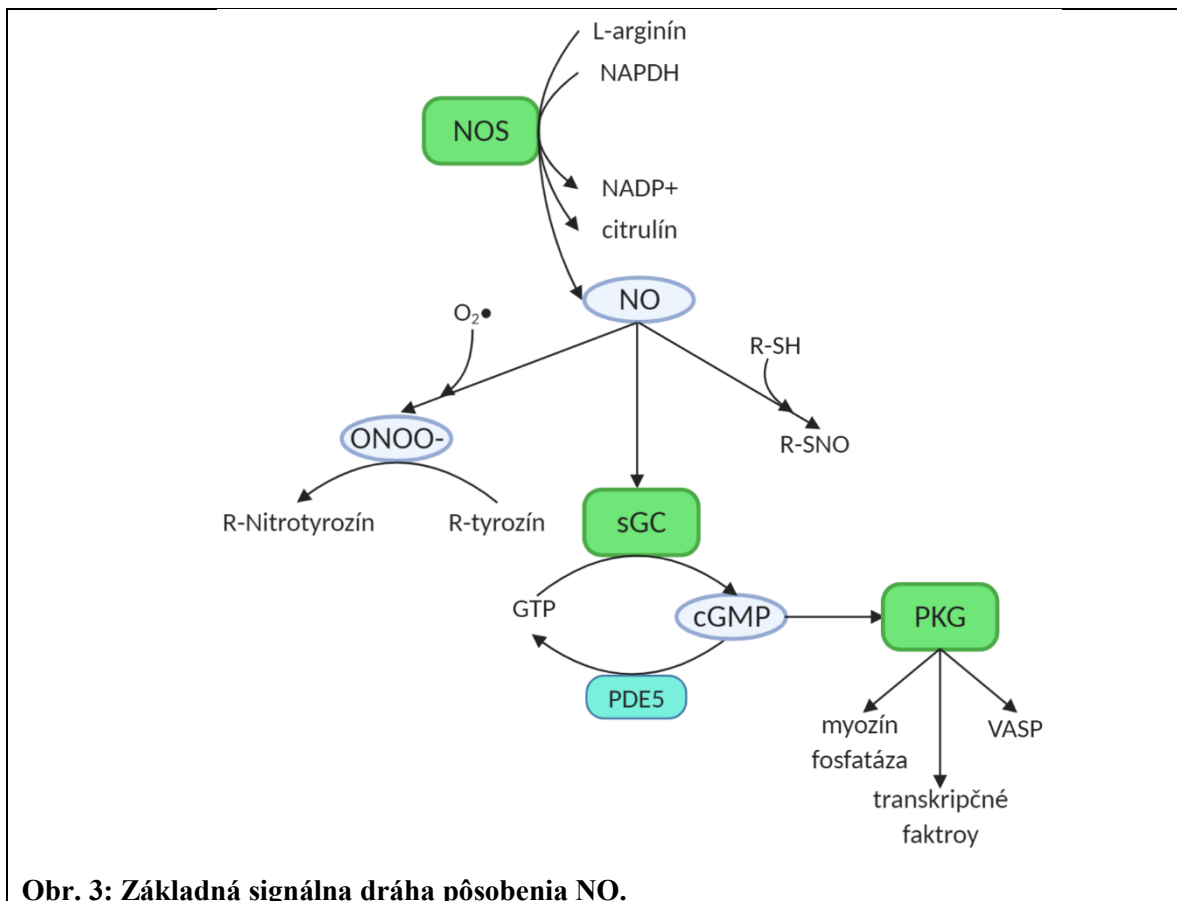
H_2S môže byť produkovaný enzymatickou aj neenzymatickou cestou. Cystationin β -syntáza je najlepšie popísaným enzýmom, ktorý produkuje H_2S , kedy cysteín a homocysteín tvoria cystationín za vzniku H_2S . Ďalšie enzýmy, ktoré môžu produkovať sulfán sú cystationín γ -lyáza, 3-merkaptopyruvát sulfur transferáza a cysteín aminotransferáza. H_2S fyziologicky modifikuje cysteín na proteínoch pomocou S-sulfhydratácie, čo je fyziologická posttranslačná modifikácia proteínov (Lin, et al., 2018). Súčasne H_2S môže mať antioxidantné vlastnosti, pretože môže reagovať s ROS (Whiteman, et al., 2004). Podobne ako u CO, tak bolo pozorované, že exogénny zdroj H_2S urýchľuje hojenie. Hydrogén sulfid sodný (donor H_2S) urýchlil hojenie kože cez zvýšenú expresiu VEGF a zníženie produkcie

ROS (Xu, et al., 2019). Podobne, donory H₂S boli použité na aktiváciu hojenia diabetickej rany (Liu, et al., 2014; Zhao, et al., 2017).

1.2.5. Oxid dusnatý (NO)

NO je krátko-žijúci radikál. Za objav signalizačných vlastností NO bola v roku 1998 udelená Nobelova cena za fyziológiu alebo medicínu Robertovi F. Furchgottovi, Louisovi J. Ignarovi a Feridovi Muradimu. Produkcia a dôležitosť NO v priebehu hojenia bola ukázaná už v 90-tych rokoch 20. storočia (Schaffer, et al., 1996). NO je produkovaný predovšetkým tromi základnými NO syntázami (NOS): neuronálna NOS (nNOS, NOS1), indukčná NOS (iNOS, NOS2) a endoteliálna NOS (eNOS, NOS3). Aktivita nNOS a eNOS je regulovaná hladinou iónov Ca²⁺ cez aktiváciu kalmodulínom (Knowles & Moncada, 1994). Na druhej strane, iNOS je trvalo viazaná s kalmodulínom a nezávislá na hladine iónov Ca²⁺. Jej aktivita je regulovaná na transkripčnej úrovni, kedy jej expresia je regulovaná transkripčnými faktormi, predovšetkým IRF1, NF-κB a AP-1 (Green, et al., 1994). Aktivované NOS premieňajú L-arginín na L-citrulín. Pri tejto premene vzniká NO ako vedľajší produkt (Forstermann & Sessa, 2012; Alderton, et al., 2001). Vznikajúci NO sa následne môže zúčastniť dvoch signálnych dráh (**Obr. 3**). Nízka hladina NO je spájaná predovšetkým s reguláciou cez „kanonickú“ dráhu, kedy produkovaný NO reaguje s aktívnym miestom solubilnej guanylátcyklázy (sGC). Aktivovaná sGC premieňa GTP na cyklické GMP (cGMP). Vznikajúce cGMP následne aktivuje proteín kinázu G (PKG, cGMP-závislá proteín kináza), ktorá fosforyluje rôzne ciele, ako je fosfatáza ľahkého reťazca myozínu, ktorá ďalej reguluje ďalšie procesy, akým je napríklad relaxácia hladkých svalov (Surks, et al., 1999).

Na druhej strane, vysoká hladina NO je spájaná s reguláciou cez cGMP-nezávislú dráhu, kedy môže mať antimikrobiálnu funkciu a stimulovať zápal (Guzik, et al., 2003). Pri vysokých hladinách, NO reaguje s ROS a vytvára peroxonitrit, ktorý následne nitrozyluje, nitruje a nitrituje rôzne proteíny (Barteseighi & Radi, 2018; Hess, et al., 2005). Napríklad, nitritácia IκBα viedla k aktivácii NF-κB, ktoré nezahrňovali fosforyláciu a degradáciu IκBα (Yakovlev, et al., 2007). Iné práce ukázali, že NO naopak inhibuje aktivitu NF-κB (Mohan, et al., 2003). Ďalej, nitrozylácia JNK, viedla k zablokovaniu interakcie JNK s c-Jun (Park, et al., 2006).



Obr. 3: Základná signálna dráha pôsobenia NO.

Úloha NO v regulácii hojenia

Produkcia NO v priebehu hojenia býva najčastejšie spájaná s aktivitou iNOS (Isenberg, et al., 2005), avšak niektoré práce ukázali dôležitosť aj eNOS (Stallmeyer, et al., 2002) a nNOS (Boissel, et al., 2004) pre správne hojenie. Koncentrácia NO produkovaná iNOS sa pohybuje v rozmedzí nM- μ M, je exprimovaná a aktívna v priebehu fázy zápalu a má úlohu predovšetkým pre reguláciu odstránenia patogénov. Koncentrácia NO produkovaná eNOS a nNOS sa pohybuje medzi pM-nM a NO produkované pomocou eNOS je dôležité vo fázach proliferácie a remodelácie (Malone-Povolny, et al., 2019).

Úloha NO v priebehu hojenia býva spájaná s reguláciou zápalu, angiogenézy a depozície kolagénu. Hlavným zdrojom NO v priebehu hojenia sú predovšetkým makrofágy (Lee, et al., 2001), avšak môže byť produkovaný aj ďalšími typmi buniek, ako sú fibroblasty a keratinocyty (Frank, et al., 2002). V priebehu fázy zápalu sa monocyty premieňajú na makrofágy, práve ktoré sú zdrojom vysokých hladín NO v priebehu prvých dní hojenia. V tejto fáze NO reaguje cez vznikajúci toxický peroxonitrit (Krausz & Friedman, 2015). Avšak, NO má ako pozitívnu, tak aj negatívnu úlohu v rámci regulácie zápalu. Napríklad, NO aktivuje promotór IL-8 génu, ale IL-8 znižuje expresiu iNOS v neutrofiloch (McCall, et

al., 1992). Ďalším príkladom je TGF- β , kedy NO vedie k aktivácii TGF- β 1 a v rovnakom čase TGF- β potláča produkciu NO (Vodovotz, et al., 1999). NO má aj úlohu chemoatraktantu, kedy reguluje migráciu monocytov a neutrofilov do poranenia. Tie následne produkujú TNF- α . Táto produkcia je regulovaná prostredníctvom cGMP-nezávislej dráhy (Lander, et al., 1993). Ďalej, NO produkovaný makrofágmi je dôležitý aj pre začatie fázy proliferácie. Keratinocyty sú stimulované na proliferáciu a migráciu na okraj rany pomocou makrofágov produkujúcich IL-6 a NO (Gallucci, et al., 2004; Zhan, et al., 2015). Následne, expresia MCP-1, produkovaného pomocou hyperproliferatívnych keratinocytov na okraji rany, je zablokovaná pomocou NO (Zeihner, et al., 1995). Ďalej, keratinocyty sprostredkovávajú angiogenézu, kedy NO produkované pomocou iNOS zvyšuje produkciu VEGF (Frank, et al., 1999). Regulácia depozície kolagénu pomocou NO je sprostredkovaná cez fibroblasty (Witte, et al., 2000), kedy vzniká kolagén III dôležitý pre formovanie dočasnej matrix. V priebehu remodelácie je kolagén III nahradzovaný za kolagén I, čo zvyšuje mechanickú pevnosť uzatvorenia reznej rany. Remodelácia je sprostredkovaná predovšetkým aktivitou MMP, ktoré sú produkované makrofágmi, epidermalnými bunkami, endotelovými bunkami a fibroblastami (Page-McCaw, et al., 2007). Jeden z efektorov regulujúcich expresiu a aktivitu MMP je aj NO. NO reguluje migráciu endotelových buniek v priebehu angiogenézy cez reguláciu expresie MMP13 (Lopez-Rivera, et al., 2005), ako aj expresiu a aktivitu MMP9 (Bove, et al., 2007). Burrow et al. (2007) pozorovali aj opačný efekt, kedy NO donory znížili expresiu MMP8 a MMP9 v normálnych ako aj diabetických fibroblastoch. Ďalej, Filippin et al. (2009) pozorovali, že NO aktivuje MMP2, ktoré je dôležité pre uvoľnenie rastového faktoru hepatocytov v priebehu regenerácie poškodených svalov.

1.3. Chronické (nehojace sa) rany

Mnoho faktorov vedie k neúplnému hojeniu, alebo k predĺženiu procesu hojenia. Vo všeobecnosti, faktory ovplyvňujúce proces hojenia môžu byť rozdelené do dvoch základných skupín (**Tab. 3**). Lokálne faktory sú faktory, ktoré priamo ovplyvňujú vlastnosti samotnej rany, zatiaľ čo systémové faktory sú celkovým stavom jedinca. Tieto faktory častokrát spolu súvisia a sú prepojené (Guo & Dipietro, 2010). Pre túto komplexnosť býva náročné študovať patogenézu chronických rán (Cano Sanchez, et al., 2018).

Tab. 3: Faktory ovplyvňujúce hojenie (Guo & Dipietro, 2010).

Lokálne faktory	Systémové faktory
Oxygenácia	Vek a pohlavie
Infekcia	Pohlavné hormóny
Cudzorodá častica	Stres
	Ischémia
	Ochorenia: napr. cukrovka, fibróza, dedičné poruchy hojenia, žltáčka, ...
	Obezita
	Lieky: glukokortikoidné steroidy, nesteroidné protizápalové lieky, chemoterapia, ...
	Alkoholizmus a fajčenie
	Podmienky poškodzujúce imunitný systém: rakovina, ožarovanie, AIDS
	Výživa

Mikroprostredie nehojajúcich rán sa najčastejšie charakterizuje chronickým stavom zápalovej odpovede, kedy makrofágy pretrvávajú v rane. To vedie k zastaveniu, alebo oneskoreniu fázy proliferácie, alebo ku senescencii buniek (Kasuya & Tokura, 2014). Ďalej, pre prostredie chronickej rany je špecifická zvýšená aktivita MMP (napr. MMP8) (Gajendrareddy, et al., 2013), znížená aktivita TIMP a zvýšené zastúpenie buniek produkujúcich zápalové cytokíny, proteolytické enzýmy a ROS (Smith, et al., 2017). Kombinácia týchto faktorov vedie k zrýchlenej degradácii ECM a rastových faktorov, zablokovaniu bunkového delenia a akumulácii nekrotického tkaniva v dôsledku ischémie. To všetko vedie k finálnemu narušeniu správneho hojenia rany (Cano Sanchez, et al., 2018).

Najčastejšie diskutovaným typom chronickej rany býva tzv. diabetická rana. V diabetickej rane sa objavujú problémy s nedostatočnou chemoatrakciou pre neutrofile a fagocyty, čo vedie k zvýšenej náchylnosti na infekciu (Alba-Loureiro, et al., 2006; Mastej & Adamiec, 2008). Nedostatočná aktivita makrofágov vedie k zníženiu uvoľňovania TNF α , IL-1 β a VEGF (Zykova, et al., 2000). Zhoršená funkcia bielych krviniek vedie k nedostatočnému procesu hojenia u diabetikov (Bagdade, et al., 1974). Ďalej, fibroblasty majú zníženú senzitivitu na odpoveď na rastové faktory a následnú zníženú schopnosť proliferácie a to vedie k zníženej tvorbe granulačného tkaniva (Loot, et al., 2002; Werner, et al., 1994). Taktiež sa objavuje zvýšená aktivita MMP2 a MMP9, čo vedie k nestabilite ECM (Signorelli, et al., 2005; Haines, et al., 2013). V diabetickej rane je pozorovaná oneskorená reepitelizácia (Loots, et al., 1998) a znížená senzitivita na VEGF, čo vedie k nedostatočnej angiogenéze (Tchaikovski, et al., 2009). Mnoho z týchto procesov je regulovaných aj NO a preto sa donory NO používajú pri liečbe diabetickej rany (Witte, et al., 2002; Spitler, et al., 2013; Edmonds, et al., 2018).

1.4. Podobnosť hojenia s nádorom

Hojenie rany a vznik a rast nádoru sú procesy, ktoré sú závislé na podobných molekulárnych mechanizmoch. Avšak, zatiaľ čo hojenie je proces, ktorý je samoregulovaný, tak vznik a rast nádoru je charakterizovaný nepretržitou aktiváciou dráh zúčastňujúcich sa tohto procesu (Arwert, et al., 2012). Zmeny v mikroprostredí v poškodenom tkanive môžu viesť k vzniku nádoru (Arwert, et al., 2012). Pre podobnosť hojenia a rastu nádoru býva nádor nazývaný ako „super hojaca sa rana“ (Haddow, 1972), alebo „rana, ktorá sa nehojí“ (Dvorak, 1986; Dvorak, 2015; Schafer & Werner, 2008). Všetky hlavné procesy pozorované v priebehu hojenia sú aktívne aj v nádore. Zápal, ktorý je nevyhnutný pre hojenie je aktívny aj v nádore (Antonio, et al., 2015; Balkwill & Mantovani, 2001). Zvýšená migrácia a proliferácia nádorových buniek je podobná s chovaním sa epitelových buniek v rane (Schafer & Werner, 2008). Remodelácia extracelulárnej matrix v priebehu neskorej fázy hojenia má tiež podobný proces v nádore, kedy nádorové tkanivo modifikuje okolitú ECM na podporenie vlastného rastu (Lu, et al., 2012). Signálne dráhy spojené s hojením sa objavujú aj v rakovine (**Tab. 4**) (Arnold, et al., 2015). Aj keď hojenie a rast nádoru sú zložité procesy, obidve sú výsledkom dvoch relatívne jednoduchých správania sa buniek – migrácia a delenie.

Tab. 4: Porovnanie signálnych dráh v priebehu hojenia a v rakovine (Arnold, et al., 2015)

Dráha	Funkcia v hojení	Funkcia v rakovine
Hedgehog	Regulácia delenia kmeňových buniek	Regulácia delenia rakovinných kmeňových buniek
	Indukcia EMT na podporu migrácie epitelových buniek	Indukcia EMT rakovinných buniek
	Angiogenéza	Angiogenéza
	Reepitelizácia a uzavretie rany	Chemorezistencia
Notch	Delenie a migrácia endotelových buniek, keratinocytov a fibroblastov na mieste rany	Prežitie a delenie rakovinných kmeňových buniek
	Migrácia buniek zápalu na miesto rany	
Wnt	Migrácia epitelových buniek	Podieľa sa na rezistencii nádorových kmeňových buniek na ožarovanie
	Samoobnovenie kmeňových buniek	Samoobnovenie rakovinných kmeňových buniek
	Plasticnosť progenitorových buniek	Plasticnosť rakovinných kmeňových buniek
	Angiogenéza	Angiogenéza
TGF- β	Infiltrácia buniek zápalu	Rast populácie rakovinných kmeňových buniek
	Delenie fibroblastov	Delenie fibroblastov
	Reepitelizácia a kontrakcia rany	Regulácia EMT rakovinných buniek
	Indukcia EMT	

IL-1 β /IL-6/STAT3	Migrácia buniek zápalu na miesto rany	Samoobnovenie rakovinných kmeňových buniek
	Delenie progenitorových buniek	Plasticnosť rakovinných kmeňových buniek
	Spustenie reepitelizácie a uzatvárania rany	Rast nádoru a metastázovanie
		Regulácia expresie génov v progresii rakoviny
IL-8	Chemoatrakcia pre migráciu buniek zápalu na miesto rany	Chemoatrakcia pre migráciu buniek zápalu do mikroprostredia nádoru
		Delenie rakovinných kmeňových buniek

Analýzy génovej expresie, ktoré využili microarray technológiu, porovnali podobnosti a rozdiely v génovej expresii medzi opravou tkaniva a rakovinou. Gény, ako sú napr. *c-FOS*, *JUN B*, *COX2*, *MCP-1*, *IL-8*, alebo *VEGF*, ktorých expresia je zmenená vo fibroblastoch v prítomnosti séra kódujú proteíny, ktoré sú potrebné pre hojenie rany (Iyer, et al., 1999). Nádory s podobnou génovou expresiou ako fibroblasty v prítomnosti séra väčšinou vedú k metastázam a smrti. To znamená, že podobnosť génovej expresie medzi nádorom a hojením umožňuje predikciu zlej prognózy (Chang, et al., 2004). Gény, ktorých expresia bola opačne regulovaná v modeloch regenerácie obličiek a rakoviny obličiek kódujú proteíny zodpovedné za morfogénu a metabolizmus glukózy. To je znakom, že väčšina nádorov produkuje ATP prostredníctvom anaeróbnej glykolýzy (Riss, J., et al., 2006). Porovnanie diferenciálne exprimovaných génov medzi vysokodeliacim sa epitelom hojacej sa rany a normálnou epidermis ukázalo, že väčšina z nich je pozorovaná aj u rakoviny kože. Gény, ktorých expresia je opačne regulovaná medzi hojením a nádorom sú spájané s ireverzibilnou stratou schopnosti kontrolovať diferenciáciu a rast s invazivitou zhubných epidermálnych rakovinových buniek (Pedersen, et al., 2003). Ďalšie porovnanie hojenia a nádoru môže poskytnúť informáciu o mechanizmoch, ktoré sa podieľajú na vypnutí mechanizmu opravy a vedú k vzniku rakoviny. Tie môžu predstavovať ďalšie ciele pri liečbe rakoviny (Schafer & Werner, 2008).

1.4.1. Úloha oxidu dusnatého v nádoroch

Podobne ako v priebehu hojenia, tak aj v nádoroch je produkovaný NO. NO v mikroprostredí nádoru zohráva ako pozitívnu tak aj negatívnu úlohu pre rast nádoru (Salimian Rizi, et al., 2017). Funkcia NO pre potlačenie rastu nádoru sa spája hlavne s aktivitou makrofágov, kedy je bunková smrť nádorových buniek spojená s produkciou NO a jeho derivátov (Hibbs, et al., 1987; Stuehr & Nathan, 1989; Cui, et al., 1994). NO-sprostredkované odstránenie nádoru bolo potlačené predovšetkým zablokovaním aktivity

iNOS (Wang, et al., 2001; Wei, et al., 2003; Kawakami, et al., 2004). V niektorých prípadoch makrofágmisprostredkovaná bunková smrť v nádore bola potlačená neznámymi faktormi, ktoré potlačili NO-sprostredkovanú protinádorovú aktivitu tým, že zabránili premene M2 makrofágov na M1 makrofágy, ktoré produkujú vyššiu hladinu NO (Dinapoli, et al., 1996; Weigert & Brune, 2008). Ďalším spôsobom akým NO vedie k potlačeniu rastu nádoru je prostredníctvom S-nitrozylácie vo vysoko glykolytických a hypoxických rakovinových bunkách. Nefunkčná mitochondriálna oxidácia vedie k akumulácii ROS. Glutatión (GSH), ktorý je zodpovedný za prevenciu pred akumuláciou ROS je S-nitrozylovaný a to zabraňuje tomu, aby GSH ochránil bunku pred oxidačným stresom spôsobeným akumuláciou ROS. To nakoniec vedie k apoptóze (Salimian Rizi, et al., 2017). Na druhej strane NO môže mať aj pronádorové vlastnosti. Niektoré nádory exprimujú vysokú hladinu iNOS, kedy NO napomáha predovšetkým angiogenéze (Jenkins, et al., 1995). Podobne, NO produkované pomocou eNOS a nNOS v stromálnych bunkách, ako sú napr. fibroblasty tiež vedie k podpore angiogenézy a výživy nádoru (Wood, et al., 1993; Wood, et al., 1994; Gallo, et al., 1998; Jadeski & Lala, 1999; Lampson, et al., 2012).

1.5. Pazúrnatka vodná ako model pre štúdium hojenia a regenerácie

Aj keď cieľom štúdiu hojenia a regenerácie je zlepšenie opravného procesu u ľudí, tak výskum na zvieracích modeloch poskytuje dôležité informácie na molekulárnej a bunkovej úrovni. Procesy embryonálneho hojenia sa študujú na organizmoch ako sú *Drosophila*, *Caenorhabditis*, alebo *Danio* (Cordeiro & Jacinto, 2013). Ďalej, embryá pazúrnatky vodnej (*Xenopus leavis*) sú veľmi populárne pre štúdium hojenia epiteliálnej rany.

Tento modelový organizmus je dlhodobo používaný na štúdium embryonálneho vývoja (Li, et al., 2016). Navyše, mnoho výsledkov popisujúcich embryonálne hojenie bolo získaných práve štúdiom hojenia embryí pazúrnatky vodnej (Li, et al., 2016; Cordeiro & Jacinto, 2013). Medzi ich výhody patrí vývoj *ex utero* (mimo telo matky), čo umožňuje ľahké sledovanie a manipuláciu embryí v ľubovoľnom vývojom štádiu. Ďalšou výhodou je ľahko indukateľná ovulácia v ktoromkoľvek ročnom období, pričom každá vedie k veľkej produkcii vajíčok. Ďalej, pazúrnatka vodná má publikovaný genóm a transkriptóm (Karimi, et al., 2018). Sú dostupné protokoly pre prácu s týmto modelom, vrátane pokročilých protokolov na editáciu genómu (Karimi, et al., 2018).

Pre štúdium embryonálneho hojenia je veľkou výhodou tohto modelu, že má veľké a ľahko kultivovateľné vajíčka, ktoré sa používajú na štúdium hojenia na úrovni jednej bunky (Sonnemann & Bement, 2011). Embryá v štádiách blastuly a gastruly boli použité na štúdium embryonálneho hojenia bez vzniku jazvy (Davidson, et al., 2002; Li, et al., 2013; Soto, et al., 2013). Schopnosť hojenia pokožky bez vzniku jazvy si zachovávajú žaby pazúrnatky až do dospelosti, aj keď táto schopnosť je časom a vývojom obmedzená (Yokoyama, et al., 2011; Bertolotti, et al., 2013; Otsuka-Yamaguchi, et al., 2017). Preto sú, na rozdiel od iných modelov, dobrým modelom na štúdium straty schopnosti hojenia bez jazvy v priebehu vývoja.

Ďalej, vývojové štádia žubrienky sú používané na štúdium regenerácie, kedy žubrienky sú schopné perfektne regenerovať chvostík po amputácii, avšak túto schopnosť strácajú na krátku dobu v priebehu tzv. refraktérnej periódy (štádium 47-49) (Fukazawa, et al., 2009; Naora, et al., 2013; Aztekin, et al., 2019). Tieto modely sa používajú aj na štúdium omnoho zložitejších mechanizmov počas regenerácie končatín a rohovky (Beck, et al., 2009).

2. Ciele práce

Cieľom tejto práce bolo štúdium úlohy NO v priebehu hojenia embryí, ktoré ešte nemajú úplne vyvinutý cievny a imunitný systém. Ako modelový organizmus boli použité embryá pazúrnatky vodnej (*Xenopus laevis*).

Hlavné ciele:

1. Popis produkcie NO v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie
2. Popis génovej expresie v priebehu hojenia a regenerácie u embryí so zablokovanou produkciou NO
3. Popis fenotypu procesov závislých na produkcii NO v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie

Vedľajšie ciele:

1. Sledovanie zmien génovej expresie v priebehu embryonálneho vývoja po zablokovaní produkcie NO
2. Porovnanie podobností a rozdielov medzi embryonálnym hojením, regeneráciou a rastom nádoru na úrovni transkripcie
3. Optimalizácia procesu prípravy suspenzie buniek pre RNA sekvenovanie na úrovni jednej bunky vzoriek pochádzajúcich z regenerujúceho sa tkaniva a nádoru

3. Materiál a metódy

3.1. Chemikálie a prístroje

3.1.1. Chemikálie

Sigma-Aldrich: L-cysteín hydrochlorid (C7880), ľudský choriový gonadotropín (C1063), RPMI-1640 (R8758), FBS (R9665), penicilín (P3032), streptomycín (S9137), DMSO (D8418), paraformaldehyd (PFA) (P6148), PBS (P5368), Tween-20 (P1379), TRIM (T7313), ODQ (O3636), TRI Reagent (T9424), DNáza I (AMPD1), 8M chlorid lítny (L7026), ampicilín (A9518), gentamycín (G1397), trietanolamín (T1502), 20x SSC (S6639), poly(vinylalkohol) (363138), glutaraldehyd (3802), PBS +/- (D8537), Sudan Black B (380B), proteáza z *Bacillus licheniformis* (C7657), priméry, Tricaine/MS-222 (E10521)

Roche: NBT (11383213001), BCIP (11383221001), DIG RNA labelling mix (11277073910), BMB blokovacia zlúčenina (11096176001), levamisol hydrochlorid (31742), DNáza I (11284932001), Akínomycín D (A1410)

Invitrogen: 1xTE (12090-015), RNaseOUT (10777019), voda (10977-035)

Qiagen – Plasmid Midi Kit (12143), kovová guľička (G9989)

Penta chemicals: etanol (71250-11000), metanol (21190-11000), chloroform (17110-11000), izopropanol (17500-11000), acetanhydrid

TATAA Biocenter: GrandScript cDNA Supermix (AS103), SYBR Grand Master Mix (TA01), RNA Spike I (RS25SI)

Cayman chemicals: DAF-2DA (85165)

Gene-tools: morfolíno-oligonukleotidy

Agilent: 5x Transcription buffer, T7 a SP6 RNA polymeráza

New England Biolabs: restričné endonukleázy, poly-A selekčný kit (E7490), NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (E7420)

Carl Roth: Triton X-100

Advanced Analytical: Standard Sensitivity RNA analysis kit (DNF-471), High Sensitivity NGS Fragment Analysis kit (DNF-474)

Miltenyi Biotec: Debris Removal Kit (130-109-398), Dead Cell Removal Kit (130-090-101)

Illumina: SureCell WTA 3' Library Prep Kit for the ddSEQ System (20014279)

Lexogen: poly-A selekčný kit (039.100), SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit (009.96), QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (015.96)

3.1.2. Protilátky

Sigma-Aldrich: Proti laminínu (T9393)

Roche: proti DIG-AP (11093274910)

ThermoFischer Scientific: proti β -katenínu (71-2700), Alexa Fluor 488 phalloidin (A12379), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (A11008)

3.1.3. Prístroje

Mikroinjektor – IM300, *Narishige*

Homogenizátor – Tissue Lyser LT, *Qiagene*

Spektrofotometer – NanoDrop 2000, *ThermoFisher*

Kapilárna elektroforéza – Fragment Analyzer, *Advanced Analytical*

Vibratóm – VT1000 S, *Leica*

Stereomikroskop – SMZ 1500, *Nikon*

Fluorescenčný stereomikroskop – MZ FLIII, *Leica*

Konfokálny mikroskop – LSM 880 NLO, *Carl Zeiss*

Disociátor – gentleMACS Octo Dissociator a gentleMACS Dissociator, *Miltenyi Biotec*

Automatické počítadlo buniek - TC20, *Bio-Rad*

Malá centrifúga na centrifugačné mikroskúmavky – 5415R, *Eppendorf*

Rotor pre centrifugačné mikroskúmavky pre malú centrifúgu – F45-24-11, *Eppendorf*

Veľká centrifúga na 15 ml skúmavky – 5804R, *Eppendorf*

Výkyvný rotor pre 15 ml skúmavky pre veľkú centrifúgu – A-4-44, *Eppendorf*

Termocykler bez kamery – C1000, *Bio-Rad*

Termocykler s kamerou – C1000 s CFX384, *Bio-Rad*

3.1.4. Roztoky

10x MBS: 880 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 30 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, pH = 7,7-7,8

1x MBS: 100 ml 10x MBS, 4 ml 5 M NaCl, 0,7 ml 1M CaCl₂, voda do 1 l

High Salt Solution (HSS): 100 ml 10x MBS, 4 ml 5 M NaCl, voda do 1 l

4 % PFA: 4 % PFA v PBS

PBT: 0,1 % Tween 20 v PBS

100x Denhartov roztok: 2 % BSA, 2 % polyvinyl pyrrolidín, 2 % Ficoll

hybridizačný roztok: 50 % formamid, 5x SSC, 100 µg/ml heparín, 1x Denhartov roztok, 0,1 % Tween 20, 0,1 % CHAPS, 10 mM EDTA

bieliaci roztok: 1,5 % H₂O₂, 5 obj. % formamid, 2x SSC

MAB: 100 mM kyselina maleínová, 150 mM NaCl, 0,2 mM NaOH, pH = 7,5

BMB zásobný roztok: 10 % v MAB

blokovací roztok: 1 BMB zásobný roztok : 1 lamb sérum : 8 MAB

AP: 100 mM tris, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, 2 mM levamisol, pH = 9,5

disociačný roztok: 5 mg/ml proteáza z *Bacillus licheniformis*, 10 mM CaCl₂, 50 µg/ml DNáza, RPMI-1640 médium

ACK roztok: 150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH = 7,3

3.2. Biologický materiál

3.2.1. Etické prehlásenie

Starostlivosť o experimentálne zvieratá a všetky experimenty s nimi boli vykonávané v súhlase so schválenými protokolmi výboru na ochranu vied Akadémie vied Českej Republiky a v súhlase s legislatívou Európskej únie.

3.2.2. Pazúrnatka vodná (*Xenopus laevis*)

Chov pazúrnatky vodnej (*Xenopus laevis*) je zavedený v rámci Biotechnologického ústavu, pričom jedinci pre chov boli zakúpení v European Xenopus Resource Centre (EXRC) Veľká Británia. K experimentom štúdia hojenia a regenerácie boli využívané embryá tohto modelového organizmu získané oplodnením *in vitro*. Samice boli stimulované 500 U ľudského choriového gonadotropínu a vajíčka boli pozbierané nasledujúci deň. Vajíčka boli oplodnené použitím zmesi získanej zo semenníkov a rôsolovitý obal vajíčok bol odstránený využitím 2 % cysteínu. Po oplodnení, embryá boli inkubované v 0,1x MBS s prídavkom gentamycínu (20 µg/ml) pri 15 °C. Vývojové štádia boli určené na základe práce Nieuwkoop & Faber (1994).

3.2.3. Bunková línia 4T1

Bunková línia myšacieho prsného karcinómu 4T1 bola dodaná firmou ATCC, USA a kultivovaná v RPMI médiu s 10 % FBS, 100 U/ml penicilínu, 100 µg/ml streptomycínu v

termostate pri 37 °C a 5 % CO₂. Po injekcii do Balb/c myši, 4T1 bunky spontánne produkujú vysoko metastázujúci nádor.

3.2.4. Myš domáca (*Mus musculus*)

Chov Balb/c myši je zavedený na Ústave molekulárnej genetiky. Pre získanie nádoru, 1x10⁶ 4T1 buniek bolo subkutánne injektovaných do Balb/c myši. Po stanovenom čase (5-25 dní) boli myši usmrtené a nádor bol odobraný pre ďalšiu analýzu.

3.3. Metódy

3.3.1. Farbenie NO

Embryá v rôznych vývojových štádiách boli poranené v prostrednej časti použitím ihly. Podobne, embryá v štádiu 41 boli uspané 5 minút v 0,025 % Tricaine a približne 50 % dĺžky chvostíka bolo amputovaných. Na detekciu produkcie NO boli embryá inkubované v médiu s obsahom DAF-2DA. Zásobný roztok DAF-2DA (5 mM v DMSO) bol nariadený 1:150 v 0,1x MBS s gentamycínom a embryá boli presunuté do tohto média 15 minút pred určeným časom analýzy. Následne boli embryá zafixované v 4 % PFA po dobu 30 minút pri izbovej teplote (napr. pre analýzu času 0, embryá boli prenesené do v média s obsahom DAF-2DA, po 15 minútach poranené a ihneď po poranení zafixované). Po fixácii, embryá boli premyté 2x 5 minút v PBT a snímané pod fluorescenčným stereomikroskopom. Intenzita fluorescencie okolo oblasti poranenia alebo amputácie bola analyzovaná v programe FiJI (NIH, v1.52n). Na výpočet korigovanej celkovej fluorescencie („Corrected Total Fluorescence“, CTF) bol použitý vzorec:

$$\text{CTF} = \text{Integrovaná hustota fluorescencie} - (\text{Plocha okolo poranenia} \\ * \text{Priemerná fluorescencia pozadia})$$

Vypočítané hodnoty boli vztiahnuté na čas 0 minút a štatistická významnosť bola vypočítaná použitím GraphPad Prism 7, jednofaktorovej ANOVA s Dunnettovým testom.

3.3.2. Injekcia morfolíno-oligonukleotidov

Všetky morfolíno-oligonukleotidy (MO) boli nariadené na finálnu koncentráciu 17 ng/nl. Množstvá injektovaných MO boli: 2 nl štandardného kontrolného MO, 2 nl *nos3*-MO, 1 nl *nos1*-MO, 3 nl zmesi *nos1+nos3*-MO v pomere 1:2, 2 nl *prkg1*-MO,

0,3 nl *lep*-MO. Všetky injekcie boli vykonané do oplodnených vajíčok. Sekvencie MO sú v **Tab. 5**.

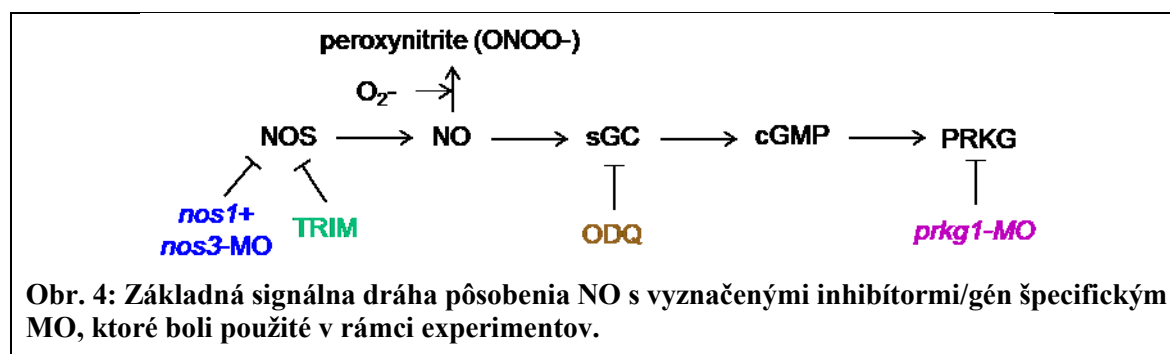
Tab. 5: Sekvencie MO použitých v analýzach.

kontrolné MO	5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'
<i>nos1</i> -MO	5'-TGG CTA AAA GAA CAC AGG ACA TCA A-3'
<i>nos2</i> -MO	5'-AGA TAA CCC TGT TTC TGT TAC CTG T-3'
<i>nos3</i> -MO	5'-AAA AGC CAA GCA CTA CTC ACC GTT T-3'
<i>prkg1</i> -MO	5'-TTC AGC TTC AAT GCT CAT ACC TGC C-3'
<i>lep</i> -MO	5'-TTG CAG TGT CCA TGT TTC TCA CCT G-3'

3.3.3. Chemická inhibícia

Produkcia NO bola zablokovaná použitím TRIM. TRIM je reverzibilný inhibitor aktivity NOS2 a NOS1 a čiastočne môže zablokovať aj aktivitu NOS3 (**Obr. 4**). Zásobný roztok TRIMu (1 M v DMSO) bol nariadený na finálnu koncentráciu 2 mM v kultivačnom médiu. Aktivita sGC bola zablokovaná použitím ODQ (**Obr. 4**). ODQ je ireverzibilný a kompetitívny inhibitor sGC. Zásobný roztok ODQ (100 mM v DMSO) bol nariadený a použitý vo finálnej koncentracii 0,2 mM v kultivačnom médiu.

Pred poranením embryí, vitelínna membrána bola manuálne odstránená z embryí v štádiu 26. Embryá pred poranením alebo amputáciou boli hodinu inkubované v médiu s inhibítorom a po celú dobu sledovania procesu hojenia a regenerácie. Na zabránenie inhibície hojenia spôsobenej materiálom uvoľňujúcim sa z embryí, médium bolo vymenené za čerstvé – ihneď, 30, 90 180 minút po poranení/amputácii a 6 hodín, 24 hodín a každý ďalší deň po amputácii.



3.3.4. Monitorovanie hojenia

Embryá vo vývojom štádiu 26 boli poranené povrchovým bodnutím ihlou na získanie poranenia podobnej veľkosti. Následne, embryá boli fotené v jednotlivých časových bodoch pod stereomikroskopom. Veľkosť poranenia bola meraná v pixeloch s využitím programu

FiJI, pričom pre zredukovanie technickej chyby bola každá veľkosť zmeraná 3 krát. Miera uzavretia poranenia bola vypočítaná podľa vzorca:

$$q_i = 1 - \frac{\bar{a}_i}{\bar{a}_0}$$

q_i – miera uzavretia poranenia v čase i

\bar{a}_i – priemerná veľkosť poranenia v čase i

\bar{a}_0 – priemerná veľkosť poranenia v čase 0 minút

Štatistická významnosť rozdielov rýchlosti zatvárania medzi podmienkami bola analyzovaná porovnaním lineárnych mixovaných modelov použitím balička pre R lme4 (v1.1-21) (Douglas, et al., 2015). Podmienka a čas boli použité ako fixné premenné a typ vzorky bol použitý ako náhodná premenná.

3.3.5. Izolácia RNA

Odobrané tkanivo (oblasť poranenia, oblasť chvostíka vedľa miesta amputácie, nádor) bolo pozbierané do 2 ml mikrocentrifugačných skúmaviek obsahujúcich predvychladenú kovovú guľičku (pre vzorky z nádoru 2 guľičky), zamrazené na suchom ľade a uskladnené v -80 °C. K vzorkám bol pridaný 1 ml TRI Reagent a vzorky boli následne homogenizované na prístroji TissueLyser LT po dobu 5 minút na 50 Hz. Tkanivo z nádoru bolo homogenizované 10 minút. Pre izoláciu RNA zo vzoriek z bunkovej kultúry (čas 0 dní rastu nádoru) bolo z kultúr odobrané kultivačné médium, následne boli premyté 2x v sterilnom PBS a zhomogenizované pridaním 1 ml TRI Reagent. Pre izoláciu RNA z bunkovej suspenzie po disociácii bol k suspenzii pridaný 1 ml TRI Reagent a vzorky boli zhomogenizované rýchlym premiešaním na vortexe.

Po homogenizácii, všetky vzorky boli vytemperované na izbovú teplotu inkubáciou 15 minút. Následne k vzorkám bolo pridané 200 μ l chloroformu. Všetky vzorky boli premiešané na vortexe 30 sekúnd. Po nasledujúcej 5 minútovej inkubácii boli vzorky znova premiešané na vortexe 10 sekúnd a inkubované pri izbovej teplote ďalších 10 minút. Nasledovala centrifugácia (10 minút, 12000 g, 2 °C), po ktorej bola vrchná vodná fáza (približne 500-600 μ l) prenesená do nových 1,5 ml mikrocentrifugačných skúmaviek s predpripravenými 700 μ l izopropanolu. Vzorky boli následne premiešané na vortexe a inkubované 30 minút pri -20 °C. Po inkubácii prebehla centrifugácia (30 minút, 16100 g, 2 °C), supernatant bol vyliaty a RNA pelet premytý v 80 % etanole. Nasledovala opätovná centrifugácia (30 minút, 16100 g, 2 °C) po ktorej bol všetok etanol odobraný a RNA pelet

bol rozpustený v 20 µl 1xTE. K vzorkám bolo pridaných 20 µl roztoku DNázy (12 µl vody, 4 µl 10x reakčného roztoku, 4 µl DNázy I), následne boli jemne premiešané a inkubované 30 minút pri izbovej teplote. Potom bolo ku všetkým vzorkám pridaných 40 µl 8 M LiCl na opakovanú precipitáciu RNA. Táto zmes bola inkubovaná cez noc na -20 °C. Ďalší deň boli vzorky scentrifugované (30 minút, 16100 g, 2 °C), supernatant bol odstránený a RNA pelet bol premytý 2x v 1 ml etanolu s následnou centrifugáciou (30 minút, 16100 g, 2 °C). Po opätovnom odstránení etanolu, RNA pelet bol rozpustený v 20 µl 1xTE. Koncentrácia RNA bola zmeraná na Nanodrop 2000 a kvalita RNA bola skontrolovaná použitím kapilárnej elektroforézy a Standard Sensitivity RNA analysis kit (**príloha 8.1**).

3.3.6. Sekvenovanie RNA

Príprava sekvenačných knižníc

Sekvenačné knižnice boli pripravené pre každý experiment zvlášť. Na analýzu zmien génovej expície v priebehu hojenia a regenerácie bolo pozbierané tkanivo z oblasti poranenia, alebo amputácie. Tkanivo z piatich embryí bolo spojené do jednej vzorky a tvorilo jeden biologický replikát.

Sekvenačné knižnice na analýzu génovej expície v priebehu hojenia po zablokovaní produkcie NO boli pripravené v časoch 0, 30, 60 a 90 minút po poranení. Na prípravu bolo použitých 500 ng celkovej RNA. V prvom kroku bol použitý poly-A selekčný kit (New England Biolabs, **príloha 8.2**) a následne boli knižnice pripravené pomocou NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina, podľa návodu od výrobcu (**príloha 8.3**). Výsledné knižnice boli ekvimolárne spojené a sekvenované na platforme NextSeq 500 v režime získania 2x 75 bázi dlhé čítania.

Sekvenačné knižnice študujúce priebeh hojenia u kontrolných embryí v časoch 0, 30, 60, 90, 180 a 360 minút po poranení boli pripravené z 500 ng celkovej RNA. Sekvenačné knižnice študujúce priebeh regenerácie v časoch 0, 30, 60, 90 minút, 3, 6, 24 hodín, 3 a 7 dní po amputácii boli pripravené z 200 ng celkovej RNA. Sekvenačné knižnice boli pripravené použitím poly-A selekčného kitu (Lexogen, **príloha 8.4**) a Lexogen SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit podľa návodu od výrobcu (**príloha 8.5**). Výsledné knižnice boli ekvimolárne spojené a sekvenované na platforme NextSeq 500 v režime získania 2x 80 báz dlhých čítaní.

Sekvenačné knižnice na analýzu rastu nádoru boli pripravené v časoch 0 (pôvodná bunecná kultúra), 5, 10, 15, 20 a 25 dní po injekcii nádoru do myši. Sekvenačné knižnice boli pripravené z 1 µg celkovej RNA použitím Lexogen QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina podľa návodu od výrobcu (**príloha 8.6**). Výsledné knižnice boli ekvimolárne spojené a sekvenované na platforme NextSeq 500 v režime získania 1x 84 báz dlhého čítania.

Analýza dát

Sekvenačné dáta boli analyzované pre každý experiment zvlášť. Zo sekvenačných čítaní z analýzy hojenia a regenerácie boli v prvom kroku odstránené nízkokvalitné čítania a sekvencie adaptérov za použitia programu TrimmomaticPE (v. 0.36) (Bolger, et al., 2014) s parametrami „CROP:70 HEADCROP:15 ILLUMINACLIP:Adapters.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36“. Čítania pochádzajúce z ribozomálnej a mitochondriálnej RNA boli odfiltrované použitím programu Sortmerna (v. 2.1b) (Kopylova, et al., 2012). Očistené čítania boli zarovnané voči genómu *Xenopus laevis* verzie 9.1 použitím programu STAR (v. 2.5.2b) (Dobin, et al., 2013). Finálna tabuľka počtu čítaní jednotlivých transkriptov bola vytvorená s využitím skriptu pre python htseq-count (v. 0.6.1p1) (Anders, et al., 2013) použitím anotácie verzie 1.8.3.2 a parametrov „-m union -s yes“. Použitý genóm a jeho anotácia boli získané z www.xenbase.org (Karimi, et al., 2018).

Sekvenačné dáta z nádoru boli spracované podobným spôsobom. V prvom kroku boli odstránené nízkokvalitné čítania použitím programu TrimmomaticSE (v. 0.36) a parametrami „CROP:84 HEADCROP:10 ILLUMINACLIP:Adapters.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36“, mitochondriálne a ribozomálne čítania boli odstránené použitím sortmerna. Finálne očistené čítania boli zarovnané voči genómu *Mus musculus* GRCm38. Finálna tabuľka počtu čítaní jednotlivých transkriptov bola vytvorená s využitím skriptu pre python htseq-count použitím anotácie genecode.vM8 a parametrov „-m union -s yes“. Použitý genóm a jeho anotácia boli získané z www.gencodegenes.org/mouse/ (Frankish, A., et al., 2019).

Diferenciálne exprimované gény (DEG) boli identifikované s použitím balíčka pre R DESeq2 (v. 1.15.51) (Love, et al., 2014) a príkazu z tohto balíčka - DESeq. V experimentoch zahŕňajúcich len jednu podmienku (hojenie v časoch 0-6 hodín, regenerácia v časoch 0-7 dní, tumor) boli DEG identifikované použitím parametrov „design = ~ time, test = 'LRT'“,

reduced = ~ 1, fitType = 'local'". V experimente s viacerými podmienkami (porovnanie kontrola vs. TRIM, kontrola vs. *nos1+nos3*-MO) boli DEG identifikované použitím parametrov „design = ~ time, test = 'LRT', reduced = ~ condition, fitType = 'local'". Finálny zoznam génov bol skontrolovaný manuálne.

Vytvorenie skupín génov

Na základe regularizovane log transformovaného normalizovaného počtu čítaní boli DEG zoskupené použitím funkcie `degPattern` z balička pre R `DEGreport` (v. 1.13.8) (Pantano, 2017). Funkcia bola použitá so základnými parametrami, s výnimkou, že bolo umožnené zobrazit' zoskupenia, ktoré obsahovali aspoň jeden gén (`minc = 1`). Podobné zoskupenia boli spojené na základe korelácie profilu (`cutoff = 0,7`) a gény s extrémne sa líšiacom profilom boli zo zoskupení odstránené (`reduce = TRUE`). Celkový počet zoskupení ($n = 36$) bol skontrolovaný manuálne a zoskupenia, ktoré mali podobný profil expsie boli spojené do jednej skupiny.

Analýza génovej ontológie

Analýza nabohatených termínov génovej ontológie (GO) bola spravená pre každú skupinu génov zvlášť použitím internetovej databázy Gorilla (Eden, et al., 2007; Eden, et al., 2009). Biologické procesy boli analyzované použitím databázy o procesoch u ľudí. Symboly génov z pazúrnatky vodnej boli prevedené na formát značenia génov u ľudí. Pretože pazúrnatka vodná je alotetraploidný organizmus, tak viac ako polovica génov je zastúpená na dvoch chromozómoch. Tieto zdvojené chromozómy sú označené ako L („long“) a S („short“) a rovnaké označenie majú gény nachádzajúce sa na týchto chromozómoch. V prípade, že skupina génov obsahovala aj L aj S formu daného génu, tak takýto gén bol použitý v analýze len raz. Ako pozadie na porovnanie nabohatených termínov génovej ontológie bol použitý zoznam všetkých známych génov v pazúrnatke vodnej. Zo zoznamu boli odfiltrované procesy s p-hodnotou väčšou ako 0,001.

3.3.7. Kvantitatívna PCR s reverznou transkripciou (RT-qPCR)

Reverzná transkripcia bola spravená z 50 ng celkovej RNA pripravenej z nezávislých vzoriek (vzorky získané z iného oplodnenia/samíc ako vzorky pre RNA sekvenovanie). Na kontrolu inhibície počas reverznej transkripcie bolo ku všetkým vzorkám pridaných 0,5 μ l RNA Spike I. Reverzná transkripcia bola vykonaná s využitím TATAA GrandScript

cDNA supermix v celkovom objeme 10 μ l. Pripravená cDNA bola nariadená 10 krát v 1xTE a 2 μ l z nej bolo použitých pre qPCR reakciu (3,5 μ l TATAA SYBR Grand Master Mix, 0,22 μ l 10 mM mixu primérov, 1,28 μ l vody). Sekvencie všetkých primérov použitých na experimenty sú v **Tab. 6**. Protokol qPCR reakcie bol: 1 minúta 95 °C; 50 opakovaní: 95 °C 3 sekundy, 60 °C 30 sekúnd, 72 °C 10 sekúnd; a nasledovala analýza krivky topenia.

Tab. 6: Zoznam primérov použitých na RT-qPCR analýzu vzoriek z pazúrnatky vodnej.

<i>lep.L</i>	TAAGAAACACTTGCAGAGGTCAA CTCGTCCTTGGATCATTGGTAG
<i>fos.S</i>	CAAGTGCCGCAACCGC GTTTGTGAGCTGCAAGGATCA
<i>mmp7.L</i>	GTGGAGTTTTAGCTCACGCC TCAAGTCCCAGAGAATGACCAA
<i>mmp9.S</i>	GTCACACCTCTGTCCTTCACTC AGCCAAGAGACCATCCTTCCT
<i>mmp1.S</i>	CCCCAGCAACAAAGGAAGAA TCCCCATCAGTTCCAAGAC
<i>mmp8.S</i>	CCAGGTGTTCCAAACAAGGT CGCAAGACTCTTCTTCGTT
<i>socs3.L</i>	TCAGTAGCTGCGGGAATTGT GGAGTGTGAGCGAGTCCTTT

3.3.8. *In situ* hybridizácia

Príprava sondy pre *in situ* hybridizáciu

E.coli kompetentné baktérie obsahujúce plazmid s génom záujmu boli inkubované cez noc pri 37 °C a trepaní 250 rpm v 50 ml LB média s prídavkom ampicilínu (50 μ g/ml). Plazmidová DNA bola následne vyzolovaná použitím QIAGEN plasmid midi kit a manuálu od výrobcu tohto kit (**príloha 8.7**).

Plazmid bol linearizovaný v roztoku obsahujúcom restričný enzým podľa **Tab. 7** pri 37 °C cez noc. Následne 1,5 μ g linearizovaného plazmidu bolo prepísané do RNA podľa reakcie: 2 μ l DIG RNA značeného mixu, 2 μ l RNA polymerázy (**Tab. 7**), 4 μ l 5x transkripčného roztoku, 2 μ l RNaseOUT a celá reakcia doplnená do 20 μ l s následnou inkubáciou 3 hodiny pri 37 °C. Následne bola RNA sonda prečistená pomocou LiCl precipitácie (objem doplnený do 50 μ l + 50 μ l 8 M LiCl a prečistenie podľa protokolu v kapitole 3.3.5).

Tab. 7: Zoznam plazmidov a enzýmov, ktoré boli použité na prípravu prób na *in situ* hybridizáciu

Gén	Zdroj	Antisense próba	Sense próba
<i>fos.S</i>	Dharmacon #MXL1736-202773077	Sall, T7	NotI, SP6
<i>mmp7.L</i>	Dharmacon #MXL1736-202774696	KpnI, T7	XhoI, SP6
<i>mmp9.S</i>	EXRC Number 851 XB-CLONE-2041688	XmaI, T7	XhoI, SP6

***In situ* hybridizácia**

Poranené embryá, alebo embryá s amputovaným chvostíkom boli zafixované v 4 % PFA cez noc a následne dehydratované premytím v metanolevej rade (25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 5 minút v každej) a uskladnené v -20 °C. V deň experimentu, embryá boli spätne rehydratované v opačnej metanolevej rade a následne premyté 3x 10 minút v PBT. Nasledovalo premytie 2x 5 minút v 0,1 M trietanolamíne, 2x 5 minút 0,1 M trietanolamín + 0,3 obj. % acetanhydrid a 3x 15 minút v PBT. Po premytí boli embryá inkubované v bieliacom roztoku (približne 2 hodiny). Po vybielení boli premyté 15 minút v roztoku 2xSSC, 2x 15 minút v PBT a presunuté do 1,5 ml mikroskúmaviiek. Následne boli inkubované v 1 ml hybridizačného roztoku pri 60 °C cez noc. Ďalší deň bol hybridizačný roztok vymenený za čerstvý predhriaty hybridizačný roztok s pridanou sondou (1 µg) a vzorky boli inkubované v hybridizačnej peci pri 60 °C cez noc.

Ďalší deň boli vzorky premyté pri teplote 60 °C 4x 30 minút v predhriatom 2xSSC a 4x 30 minút v predhriatom 0,2x SSC. Následne boli vzorky presunuté do 12 jamkovej kultivačnej doštičky a premyté pri izbovej teplote 1x 15 minút v 0,2x SSC izbovej teploty. Následne boli vzorky premyté 3x 15 minút v MAB, inkubované 3 hodiny v blokovacom roztoku a následne inkubované v blokovacom roztoku s protilátkou (0,63 µl DIG-AP/1 ml blokovacieho roztoku) 2 dni pri 4 °C.

Potom boli vzorky premyté 6x 30 minút v MAB a 2x 30 minút v AP. Následne boli inkubované v tme vo farbiacom roztoku (36 µl NBT a 28 µl BCIP na 10 ml AP + 1 % PVA) približne 2-3 hodiny. Následne boli vzorky premyté 3x 10 minút v AP. Na zníženie pozadia boli vzorky premyté 5x 2 minúty v 100 % metanole a rýchlo rehydratované v metanolevej rade (75 %, 50 %, 25 %, 2 minúty v každej) a na záver premyté 3x 10 minút v PBT. Na záver boli embryá zafixované v 4 % PFA a snímané pod stereomikroskopom.

3.3.9. Imunohistochemia

Poranené embryá boli zafixované v 4 % PFA cez noc, premyté 3x 15 minút v PBT a zaliate do 4 % agarózy. V ďalšom kroku boli vzorky nakrájané na vibratóme na 150 μ m rezy. Tie boli potom inkubované 2 hodiny v blokovacím roztoku pri izbovej teplote. Následne bola k vzorkám pridaná primárna protilátka proti β -katenínu (1:1000), proti laminínu (1:150) alebo Alexa Fluor 488 phalloidín (1:1000) na označenie aktínu. Vzorky boli inkubované cez noc pri 4 °C. Následne boli vzorky premyté 3x 15 minút v PBT. Ďalej, vzorky pre značenie β -katenínu, alebo laminínu boli inkubované cez noc pri 4 °C so sekundárnou protilátkou Alexa 488 goat anti-rabbit (1:500) v blokovacím roztoku. Vzorky boli opäť premyté 3x 15 minút v PBT, následne boli inkubované 1 minútu v roztoku DAPI (1:1000 zriedený v PBT) a opäť premyté 3x 15 minút v PBT. Na záver boli vzorky namontované na podložné sklíčka v montovacom médiu a snímané pod konfokálnym mikroskopom.

3.3.10. Značenie neutrofilov pomocou Sudan Black B

Embryá s amputovaným chvostíkom boli zafixované 1 hodinu v roztoku glutaraldehydu pri 4 °C. Následne boli opláchnuté 3x v destilovanej vode. Potom boli inkubované 30 minút pri 4 °C v roztoku Sudan Black B. Následne boli 5-7x premyté v 100 % etanole a rehydratované v etanolovej rade (75 %, 50 %, 25 %, PBT, 5 minút v každej). Následne boli embryá inkubované v bieliacom roztoku cez noc. V poslednom kroku boli embryá premyté v PBT a snímané pod stereomikroskopom.

3.3.11. RNA-Seq na úrovni jednej bunky (scRNA-Seq)

Príprava bunkovej suspenzie

Nádory boli získané podľa protokolu v kapitole 3.2.4. Po 10 dňoch boli nádory zvážené a pozbierané do 1,5 ml mikroskúmaviek obsahujúcich 300 μ l disociačného roztoku, rozbité použitím polypropylénovej homogenizačnej paličky. Následne boli presunuté do gentleMACS C skúmaviek obsahujúcich 5 ml disociačného média. K niektorým vzorkám (podľa experimentálnych podmienok) bol v disociačnom roztoku pridaný ActD nariadený na finálnu koncentráciu 2 nM (zásobný roztok 4 mM v DMSO) a vo všetkých ďalších roztokoch nariadený na finálnu koncentráciu 0,2 nM. Vzorky určené na disociáciu pri 37 °C boli inkubované na gentleMACS Octo Dissociator podľa programu uvedeného v **Tab. 8**.

Vzorky určené na disociáciu pri 4 °C boli miešané použitím gentleMACS Dissociator 2x na programe m_impTumor_02.01 a otáčané na rotujúcej platforme 20 minút pri otáčkach 20 rpm. Tento postup bol zopakovaný 3x pre celkovú dobu disociácie 1 hodina a celý proces prebiehal v chladovej miestnosti pri 4 °C. V ďalších krokoch, pokiaľ nie je uvedené inak, boli všetky používané média, filtre a aj kolónky predvychladené na 4 °C a so suspenziou buniek bolo manipulované výhradne na ľade.

Tab. 8: Program disociácie nádoru na gentleMACS Octo Dissociator.

1. ramp 200 rpm, 10"
2. loop 3x
3. spin -200 rpm, 1"
4. spin 200 rpm, 10"
5. end loop
6. temp ON
7. loop 2x
8. spin -30 rpm, 30'
9. spin 200 rpm, 10"
10. end loop
11. temp OFF
12. end

Okamžite po disociácii boli všetky vzorky umiestnené na ľad. Bunková suspenzia bola prefiltrovaná cez 30 µm filter do 15 ml centrifugačných skúmaviek. Suspenzia buniek bola centrifugovaná (5 minút, 800 g, 2 °C, minimálna akcelerácia a brzdenie), supernatant bol vyliaty a k bunkám, na odstránenie erytrocytov, bolo pridaných 15 ml studeného ACK roztoku. Suspenzia buniek bola okamžite centrifugovaná (5 minút, 800 g, 2 °C, minimálna akcelerácia a brzdenie), rozsuspendovaná v 3,1 ml studeného PBS -/-. K tejto suspenzii bolo pridaných 900 µl studeného Debris Removal Solution. Na vrch bolo opatrne navrstvených 4 ml PBS -/- a suspenzia bola centrifugovaná (10 minút, 3000 g, 2 °C, maximálna akcelerácia a brzdenie). Bolo odobraných 5 ml z vrchnej fázy, skúmavka bola doplnená s PBS -/- a premiešaná jemným otočením 3x a centrifugovaná (5 minút, 800 g, 2 °C, minimálna akcelerácia a brzdenie). Supernatant bol odobraný a na odstránenie mŕtvych buniek bolo k roztoku pridaných 200 µl Dead Cell Removal roztoku izbovej teploty a suspenzia bola inkubovaná 15 minút pri izbovej teplote. Počas inkubácie boli pripravené premývacie kolónky, ktoré boli umiestnené na magnet a premyté s 500 µl vychladeného 1x Binding Solution. Následne bolo k suspenzii buniek pridaných 800 µl 1x Binding Solution a suspenzia bola nanosená na premývacie kolónky a filtrát bol zbieraný do nových 15 ml centrifugačných skúmaviek. Po takmer úplnom pretečení roztoku boli kolónky

premyté 4x 500 µl 1x Binding Solution a filtrát bol zbieraný do rovnakých skúmaviek. Pozbieraný filtrát bol centrifugovaný (5 minút, 800 g, 2 °C, minimálna akcelerácia a brzdenie) a bunky boli rozsuspendované v 100 µl PBS-/- s 0,4 % BSA. Bunky boli spočítané na automatickom počítadle buniek, opätovne centrifugované a nariedené v PBS-/- s 0,4 % BSA na finálnu koncentráciu 2500 buniek/µl. Bunky, ktoré neboli použité na prípravu sekvenačnej knižnice boli zamrazené na suchom ľade a uchované v -80 °C. Tieto vzorky boli potom použité na analýzu génovej expresie pomocou RT-qPCR. Zoznam primérov použitých na RT-qPCR je v **Tab. 9**.

Tab. 9: Zoznam primérov použitých na RT-qPCR analýzu vzoriek z nádoru.

<i>Fos</i> NM_010234.3	GGTGAAGACCGTGTCAGGAG AGCCATCTTATTCCGTTCCCTT
<i>Wfdc2</i> NM_026323.2	TTACGGACTGTGTGTTGGAGT CTGAGAGTTTAGTATCTGTCCCTGA
<i>Fcgr3</i> NM_010188.5	AGTGGGGACTACTACTGCAAA CAGACTAGAGAGATGGAGGATGT
<i>Ccl5</i> NM_013653.3	TCAAGGAGTATTTCTACACCAGCA CCCTCTATCCTAGCTCATCTCCA
<i>Thy1</i> NM_009382.3	TCCAAGTCGGAACCTTTGGC AGGCGAAGGTTTTGGTTCAC
<i>Actb</i> NM_007393.5	GCTCCTAGCACCATGAAGAT TAAAACGCAGCTCAGTAACAG

Príprava sekvenačných knižníc

Prípravené boli celkovo dva technické replikáty na podmienku (celkovo 8 vzoriek). Knižnice na sekvenáciu RNA z jednotlivých buniek boli pripravené použitím SureCell WTA 3' Library Prep Kit for ddSEQ System podľa protokolu od výrobcu (**príloha 8.8**). Kvalita pripravených knižníc bola otestovaná použitím Fragment Analyzer NGS High Sensitivity Kit (**príloha 8.9**). Ekvimolárne spojené knižnice boli sekvenované na prístroji NextSeq 500 v režme – čítanie 1: 70 cyklov, index 1: 8 cyklov, čítanie 2: 88 cyklov.

Analýza dát

Dáta boli analyzované použitím balíčka programov umi-tools (v. 1.0.0) (Smith, et al., 2017) podľa doporučeného návodu s menšími modifikáciami. Príkaz umi_tools whitelist bol použitý na identifikáciu značiek prislúchajúcich pre jednotlivé bunky s fixne zadaným počtom buniek ako 2000.

```
umi_tools whitelist --bc-pattern=\
"(?P<discard_1>.{0,5})(?P<cell_1>.{6})(?P<discard_2>TAGCCATCGCATTGC){e<=1}(?P<c
ell_2>.{6})(?P<discard_3>TACCTCTGAGCTGAA){e<=1}(?P<cell_3>.{6})(?P<discard_4>AC
G)(?P<umi_1>.{8})(?P<discard_5>GAC).*" \
--extract-method=regex --stdin raw/1A_1.fastq.gz \
--plot-prefix=whitelist/1A_whitelist --set-cell-number=20000 \
--log2stderr > whitelist/1A_whitelist.txt;
```

Príkaz `umi_tools extract` bol použitý na skopírovanie značky bunky z čítania 1 do názvu čítania 2. List značiek vygenerovaný v predchádzajúcom kroku bol použitý na určenie správnych značiek.

```
umi_tools extract --bc-pattern=\
"(?P<discard_1>.{0,5})(?P<cell_1>.{6})(?P<discard_2>TAGCCATCGCATTGC){e<=1}(?P<c
ell_2>.{6})(?P<discard_3>TACCTCTGAGCTGAA){e<=1}(?P<cell_3>.{6})(?P<discard_4>AC
G)(?P<umi_1>.{8})(?P<discard_5>GAC).*" \
--extract-method=regex --stdin raw/1A_1.fastq.gz \
--stdout umitools/umi_1A_1.fastq.gz --read2-in raw/1A_2.fastq.gz \
--read2-out=umitools/umi_1A_2.fastq.gz --error-correct-cell \
--filter-cell-barcode --whitelist=whitelist/1A_whitelist.txt;
```

Od ďalšieho kroku boli analyzované už len čítania 2. Podobne ako v kap. 3.3.6, boli odstránené nízkokvalitné čítania a sekvencie adaptérov použitím `TrimmomaticSE` a prečistené čítania boli zarovnané voči genómu myši použitím programu `STAR`.

```
TrimmomaticSE -threads 10 -phred33 umitools/umi_1A_2.fastq.gz trimmomatic/TRIM_1A_2.fastq \
ILLUMINACLIP:~/Adapters/ddSeq_SureCell.fa:2:30:10 \
LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36 2> log/1A_trim.log;
```

```
~/STAR-2.7.1a/bin/Linux_x86_64/STAR \
--genomeDir ~/Genomes/GRCm38 \
--readFilesIn trimmomatic/TRIM_1A_2.fastq \
--runThreadN 10 --outFileNamePrefix STAR/1A/1A --outFilterMultimapNmax 1 \
--outSAMtype BAM SortedByCoordinate;
```

V ďalšom kroku, boli čítania priradené ku génom použitím balíčku `featureCounts` (v. 1.6.0) (Liao, et al., 2014).

```
featureCounts -a /mnt/f/Genomes/GRCm38/gencode.vM8.annotation_with_Luc.gtf \
-o featureCounts/1A -R BAM STAR/1A/1AAligned.sortedByCoord.out.bam -T 10 -s 1;
```

Na záver, čítania v získaných BAM súboroch boli usporiadané použitím balíčku `samtools` (v. 1.7) (Li, et al., 2009; Li, 2011) a príkazu `samtools sort`. Príkaz `samtools index` bol použitý na vytvorenie indexu usporiadaných BAM súborov.

```
samtools sort featureCounts/1AAligned.sortedByCoord.out.bam.featureCounts.bam \
-o featureCounts/1A_sorted.bam;
```

```
samtools index featureCounts/1A_sorted.bam;
```

Konečná tabuľka obsahujúca počet čítaní pre konkrétny gén a konkrétnu bunku bola vytvorená použitím príkazu `umi_tools count`.

```
umi_tools count \  
--per-gene --gene-tag=XT --assigned-status-tag=XS --per-cell \  
-I featureCounts/1A_sorted.bam -S count/1A.tsv --wide-format-cell-counts;
```

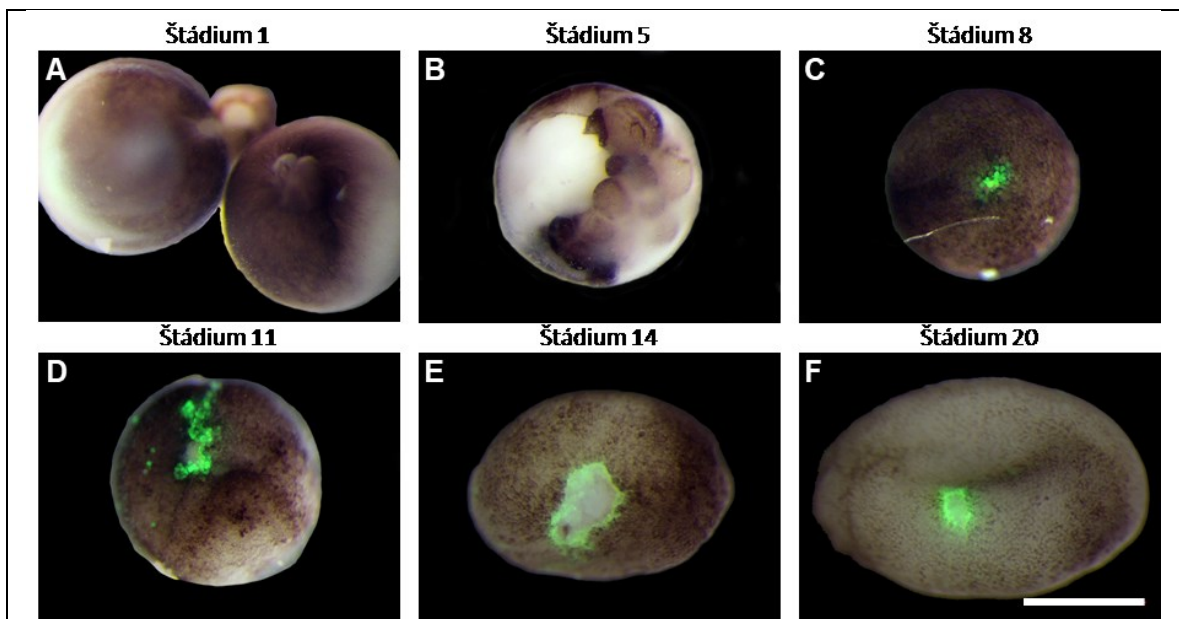
Získané tabuľky boli analyzované v programe R. V prvom kroku bol použitý balíček `DropletUtils` (v 1.2.2) (Lun, et al., 2019) na identifikáciu prázdnych kvapiek v datasete a len kvapky, ktoré mali viac ako 200 alebo menej ako 5000 čítaní a FDR menší ako 0,05 boli považované za kvapky obsahujúce bunky a boli použité v ďalšej analýze. Balíček `Scater` (v 1.10.1) (McCarthy, et al., 2017) bol použitý na normalizáciu dát medzi bunkami a vzorkami. Po normalizáciu boli identifikované zoskupenia buniek pomocou funkcie `UMAP` (v 0.3.9) (Becht, et al., 2018; McInnes, et al., 2018). Dve zoskupenia boli identifikované ako kvapky obsahujúce aj nečistoty a boli vylúčené z ďalšej analýzy. Na záver ostalo celkovo 654 buniek. Tie boli zoskupené pomocou opätovného použitia funkcie `UMAP` do 4 skupín. Typ populácie buniek v každej skupine bol určený podľa markerových génov identifikovaných použitím príkazu `FindConservedMarkers` z balíčku `Scater`.

4. Výsledky

4.1. Produkcia NO počas embryonálneho hojenia a regenerácie

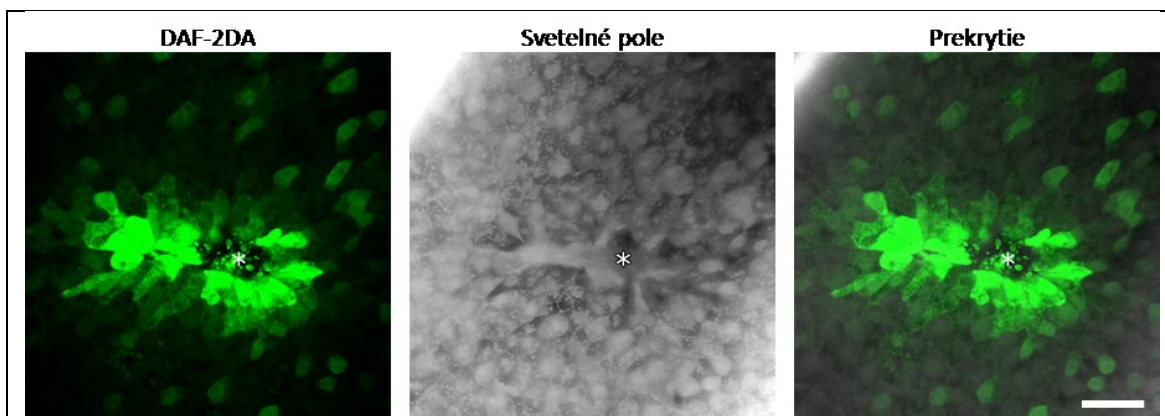
4.1.1. Produkcia NO po poranení embryí v ranných štádiách vývoja

Najznámejšou úlohou NO počas hojenia je regulácia odpovede imunitného a cievneho systému (Witte & Barbul, 2002). V našich experimentoch sme sa zamerali na sledovanie produkcie NO u embryí pazúrnatky vodnej v ranných štádiách vývoja, kedy imunitný ani cievny systém ešte nie je plne vyvinutý, alebo ich vývoj je v ranných fázach. Na detekciu sme použili indikátor NO – DAF-2DA a sledovali sme produkciu NO 15 minút po poranení u štádií: 1 (oplodnené vajíčko), 5 (morula), 8 (blastula), 11 (gastrula), 14 (skorá neurula), 20 (neskorá neurula, prvé náznaky začiatku vývoja primitívnych buniek imunitného systému) (**Obr. 5**). Aj napriek tomu, že sme neboli schopní detegovať produkciu NO po poranení v štádiách 1 a 5 (**Obr. 5A,B**), už v štádiu blastuly sme pozorovali výraznú produkciu NO (**Obr. 5C**). Pri detailnej analýze miesta poranenia sme sledovali výraznú produkciu NO len v prvých dvoch vrstvách buniek v okolí poranenia (**Obr. 6**).



Obr. 5: Produkcia NO po poranení ranných štádií embryí pazúrnatky vodnej.

Embryá boli poranené použitím ihly a následne inkubované 15 minút v médiu obsahujúcom DAF-2DA (indikátor produkcie NO). Následne boli embryá zafixované v PFA a produkcia NO bola zdokumentovaná fluorescenčným stereomikroskopom. Produkcia NO bola študovaná v štádiách (A) oplodneného vajíčka, (B) moruly, (C) blastuly, (D) gastruly, (E) skorej neuruly a (F) neskej neuruly. (Zväčšenie = 3x, Mierka = 500 μ m)



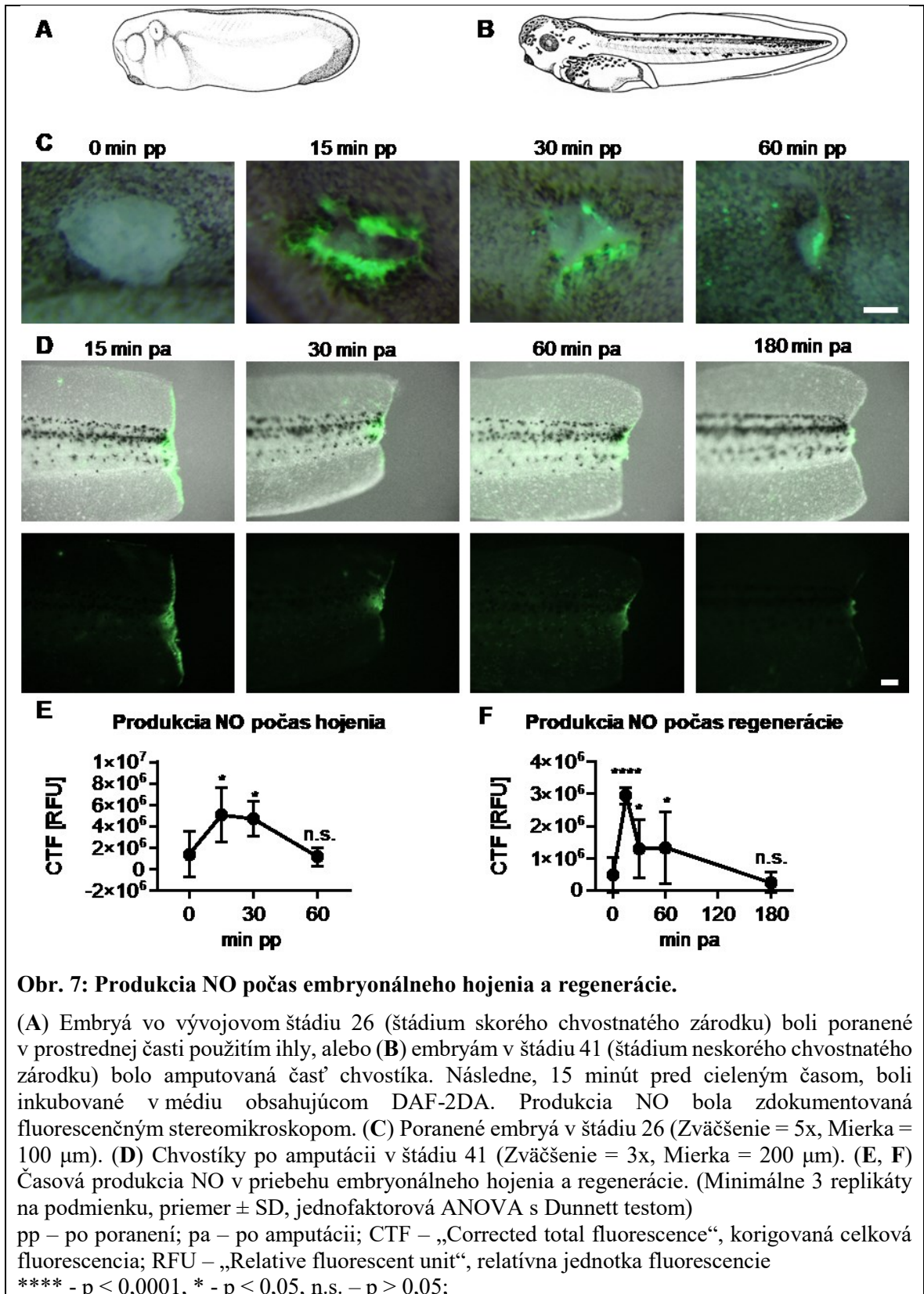
Obr. 6 Detailná analýza produkcie NO po poranení embrya pazúrnatky vodnej vo vývojovom štádiu 26.

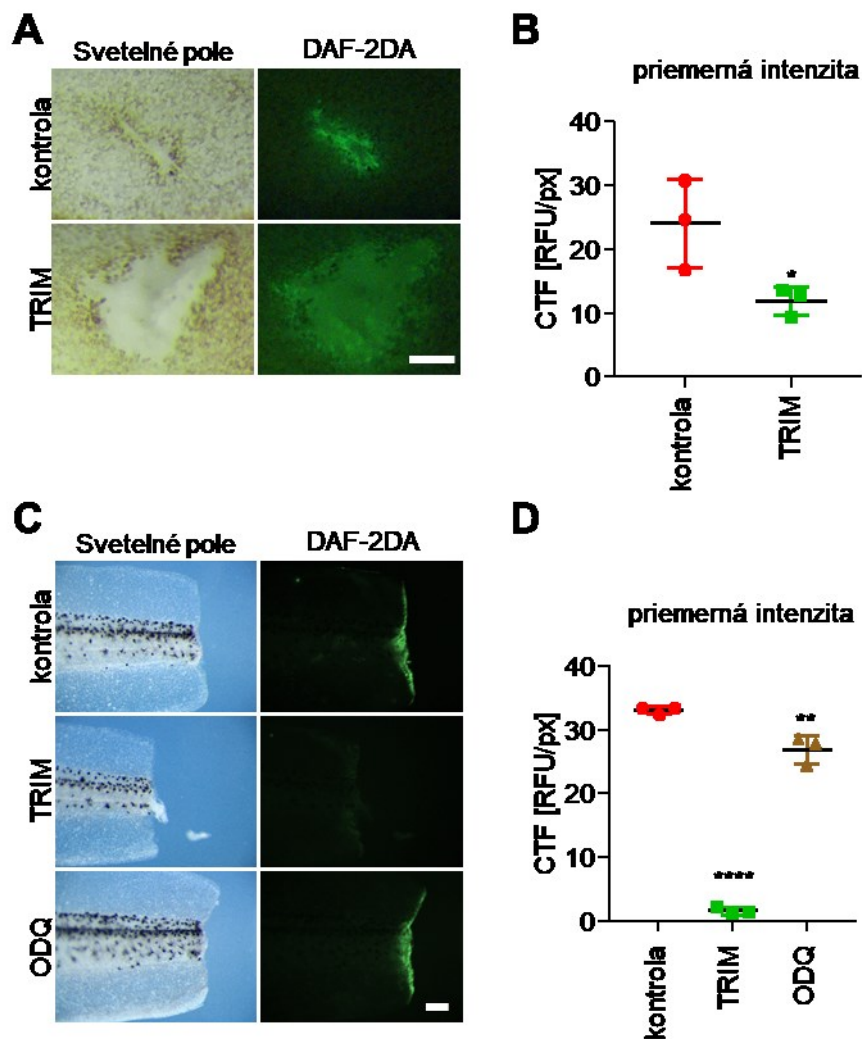
Embryá vo vývojovom štádiu 26 (štádium skorého chvostnatého zárodka) boli poranené v prostrednej časti použitím ihly a následne inkubované 15 minút v médiu obsahujúcom DAF-2DA. Následne boli zafixované v PFA a zdokumentované použitím konfokálneho mikroskopu Leica SPE (Mierka = 20 μm).

4.1.2. Časová produkcia NO po poranení embryí

Pre lepšie porozumenie mechanizmu regulácie hojenia vplyvom NO sme sledovali produkciu NO v priebehu času po poranení embryí pazúrnatky vodnej. Pre podporu pozorovaní získaných pri štúdiu procesu embryonálneho hojenia sme výsledky porovnávali s výsledkami získanými pri pozorovaní regenerácie chvostíka. Produkciu NO sme študovali v priebehu hojenia v štádiu 26 (**Obr. 7A**) a regenerácie po amputácii chvostíka v štádiu 41 (**Obr. 7B**). V obidvoch prípadoch sme pozorovali maximálnu produkciu NO už 15 minút po poranení/amputácii. Následne hladina NO rýchlo klesala. 60 minút po poranení (**Obr. 7C, E**) a 180 minút po amputácii (**Obr. 7D, F**) sa hladina NO vrátila na fyziologické hodnoty.

Pre potvrdenie špecificity DAF-2DA voči NO sme testovali produkciu NO po poranení a amputácii u embryí so zablokovanou produkciou NO pomocou NO inhibítora TRIM. Ako negatívna kontrola bol použitý inhibítor ODQ, ktorý je inhibítorom sGC (**Obr. 4**). Pozorovali sme, že použitie TRIM viedlo k signifikantnému zníženiu intenzity fluorescencie po poranení embryí v štádiu 26 (**Obr. 8A, B**). Avšak, kvôli autofluorescencii tukovej oblasti embryí v tomto vývojovom štádiu bola pozorovaná zvýšená fluorescencia rany. Použitie TRIM po amputácii chvostíka embryí v štádiu 41 viedlo k takmer úplnému zablokovaniu fluorescenčného signálu, zatiaľ čo použitie ODQ viedlo len k miernemu zníženiu intenzity fluorescencie (**Obr. 8C, D**).





Obr. 8: Test efektivity TRIM inhibítora na zablokovanie produkcie NO a špecificity DAF-2DA próby na detekciu NO.

Embryá vo vývojovom štádiu 26 a embryá v štádiu 41 boli inkubované 1 hodinu pred poranením/amputáciou v TRIM (6 mM/1 mM) alebo ODQ (100 μ M). Ihneď po poraní, alebo amputácii boli inkubované 15 minút v médiu obsahujúcom DAF-2DA. Následne boli zafixované v PFA a produkcia NO bola zdokumentovaná fluorescenčným stereomikroskopom. (A) Porané embryá v štádiu 26 (Mierka = 100 μ m). (B) Intenzita fluorescenčného signálu (3 replikáty, priemer \pm SD, t-test). (C) Chvostíky po amputácii v štádiu 41 (Mierka = 500 μ m). (D) Intenzita fluorescenčného signálu (3 replikáty, priemer \pm SD, t-test).

**** - $p < 0,0001$, ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$;

4.2. Vplyv produkcie NO na efektivitu embryonálneho hojenia a regenerácie

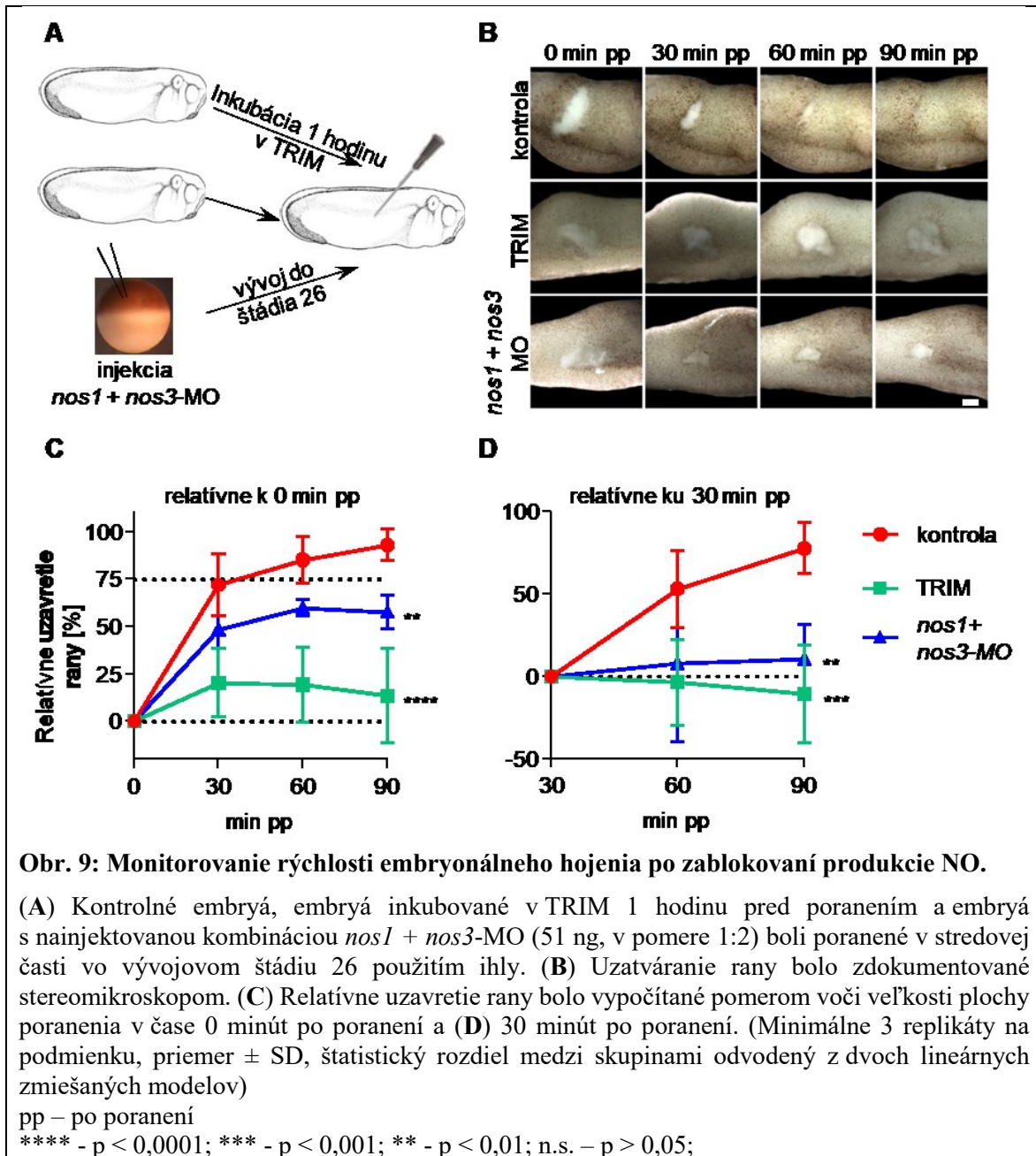
4.2.1. Zmena rýchlosti embryonálneho hojenia po zablokovaní produkcie NO

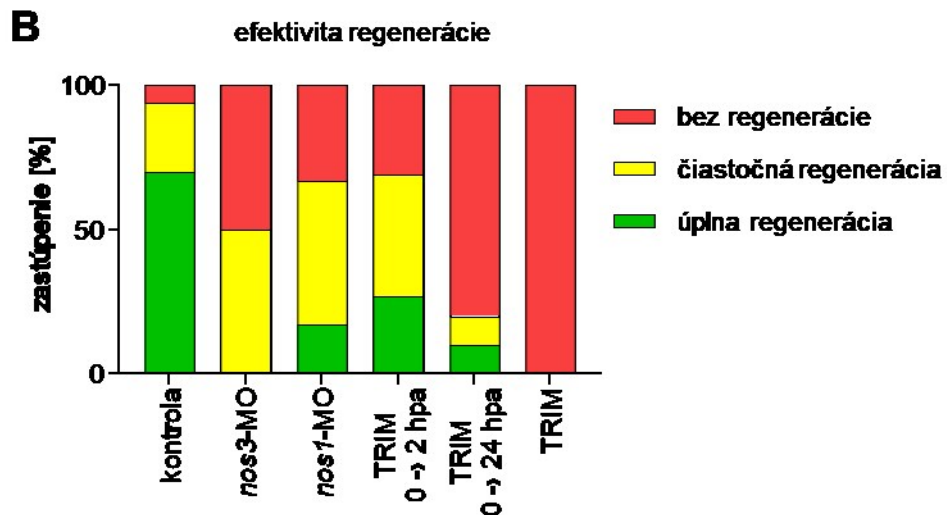
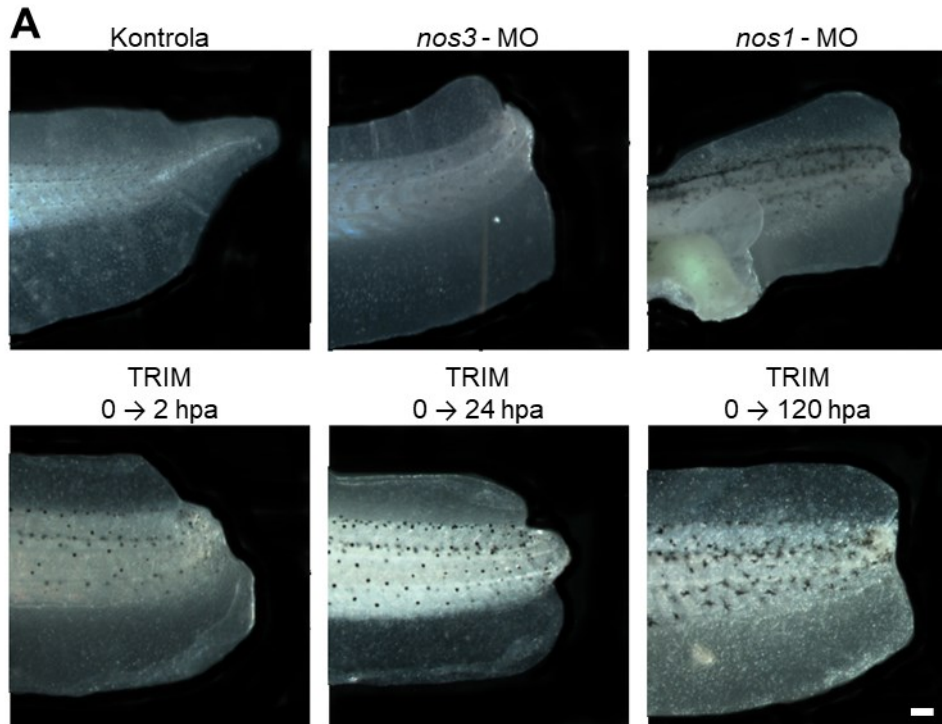
V ďalšom kroku sme sa zamerali na potvrdenie dôležitosti produkcie NO počas hojenia u embryí bez vyvinutého cievneho a imunitného systému. V tejto práci sme porovnávali dva efekty inhibície produkcie NO (**Obr. 9A**). Sledovali sme akútne/okamžité zablokovanie NOS použitím chemického inhibítora TRIM krátko pred poranením a chronickú/dlhodobú stratu funkcie NOS nainjektovaním *nos1* a *nos3* MO do vajíčka po oplodnení.

Embryá v štádiu 26 sme poranili a sledovali rýchlosť uzatvárania poranenia (**Obr. 9A,B**). Zatiaľ čo kontrolné embryá uzavreli 75 % veľkosti rany už 30 minút po poranení, tak *nos1* + *nos3*-MO embryá uzavreli len necelých 50 % veľkosti rany a TRIM embryá dokonca len 15 % (**Obr. 9C**). Navyše, zatiaľ čo v ďalšom časovom intervale pokračovalo uzatváranie rany u kontrolných embryí a 90 minút po poranení bola rana úplne uzavretá, tak u embryí so zablokovanou produkciou NO došlo k zastaveniu uzatvárania 30 minút po poranení (**Obr. 9D**).

4.2.2. Vplyv zablokovania produkcie NO na efektivitu regenerácie

Dôležitosť NO sme študovali aj v priebehu regenerácie. Sledovali sme efektivitu regenerácie u embryí s nainjektovaným *nos1*-MO alebo *nos3*-MO a u embryí inkubovaných v TRIM. Pre potvrdenie dôležitosti NO produkcie na začiatku regenerácie sme embryá inkubovali v TRIM len počas prvých 2 hodín po amputácii, prvých 24 hodín po amputácii, alebo v priebehu celej doby (**Obr. 10A**). Efektivitu regenerácie sme vyhodnotili 5 dní po amputácii. 70 % kontrolných embryí sa regenerovalo úplne a len 6 % sa neregenerovalo vôbec (**Obr. 10B**). U všetkých ostatných podmienok došlo k výraznému poklesu počtu embryí, ktoré sa regenerovali úplne. Zablokovanie NO produkcie len počas prvých dvoch hodín regenerácie viedlo k poklesu úplne regenerovaných embryí na 27 %, čo potvrdilo dôležitosť produkcie NO bezprostredne po amputácii.





Obr. 10: Monitorovanie efektivity regenerácie po zablokovaní produkcie NO.

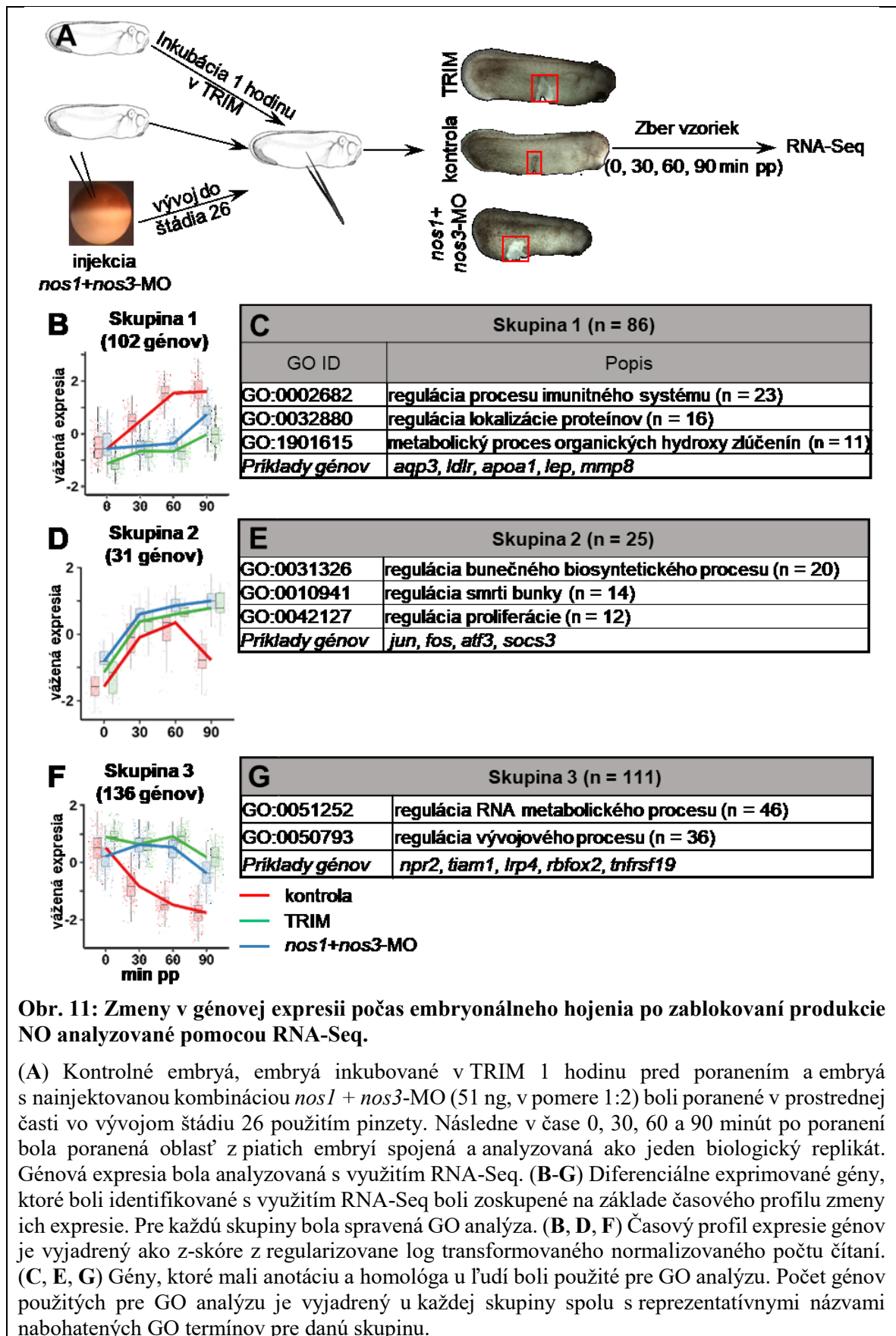
(A) Kontrolným embryám, embryám s nainjektovaným *nos1*-MO alebo *nos3*-MO a embryám inkubovaným v TRIM 1 hodinu pred amputáciou bola amputovaná vo vývojovom štádiu 41 časť chvostíka. 5 dní po amputácii bola vyhodnotená efektivita regenerácie. (B) U každého embrya bola efektivita regenerácie chvostíka určená manuálne a taktiež bolo vyhodnotené zastúpenie jednotlivých typov (najmenej 12 embryí na podmienku).

4.3. Regulácia génovej expresie vplyvom NO v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie

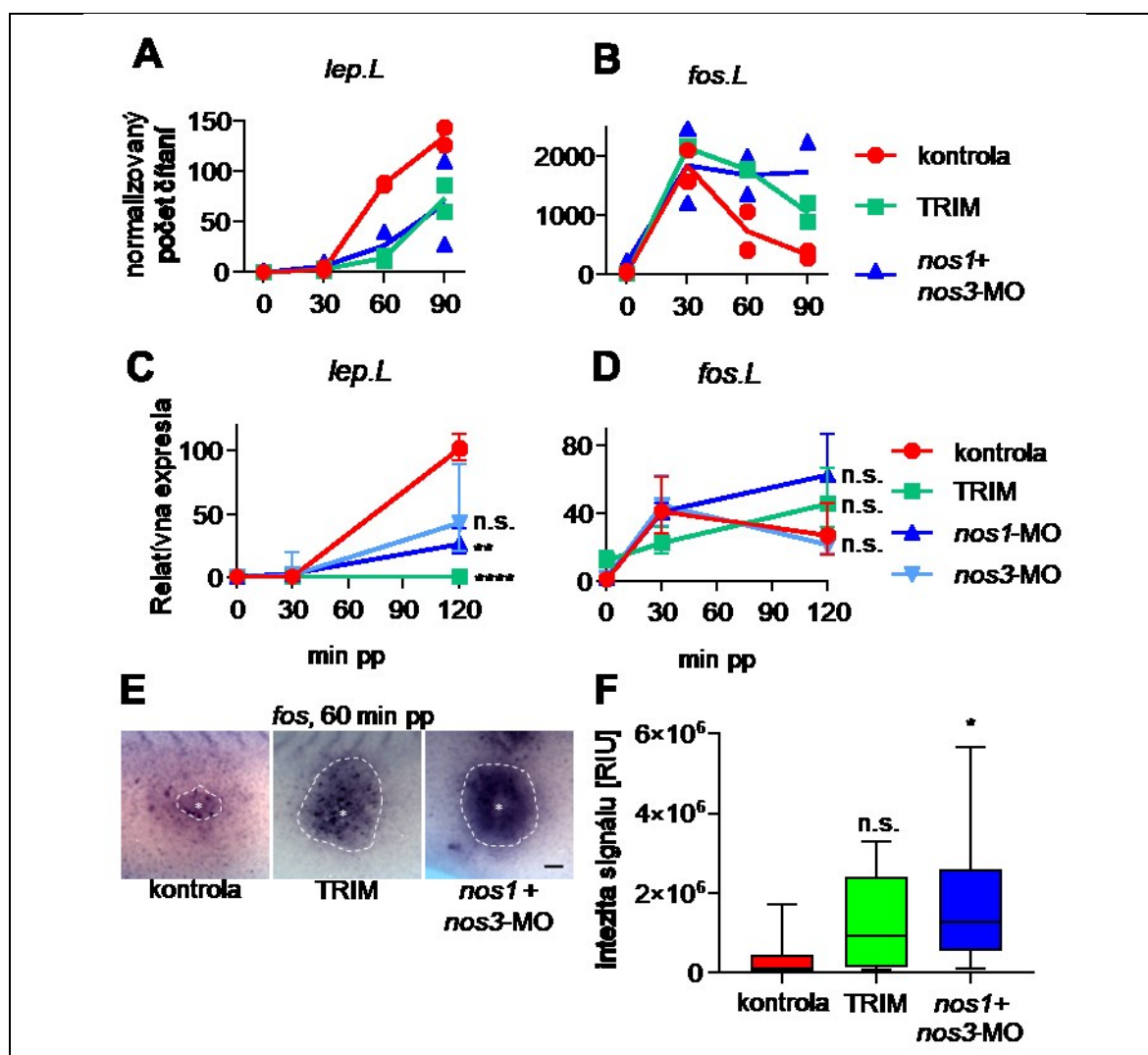
4.3.1. Zmeny v génovej expresii v priebehu embryonálneho hojenia po zablokovaní produkcie NO

V ďalšom kroku sme sa zamerali na porovnanie zmien v génovej expresii počas hojenia a regenerácie u embryí so zablokovanou produkciou NO. Podobne ako v **kap. 4.2.1** sme zablokovali produkciu NO a následne sme sledovali zmeny v génovej expresii počas prvých 90 minút embryonálneho hojenia pomocou metódy RNA-Seq (**Obr. 11A**). Identifikovali sme celkovo 269 génov s odlišným profilom expresie medzi kontrolnými embryami a embryami so zablokovanou produkciou NO. Tieto gény sme rozdelili do troch skupín:

Skupina 1 obsahuje 102 génov (86 z nich, ktoré mali anotáciu a homológa u ľudí, bolo použitých pre GO analýzu). Expresia týchto génov rástla u kontrolných embryí, ale u embryí so zablokovanou produkciou NO bola ich expresia nezmenená, alebo neboli vôbec exprimované (**Obr. 11B**). Na základe GO analýzy sme zistili, že tieto gény sú zodpovedné predovšetkým za reguláciu imunitnej odpovede a reguláciu metabolických procesov (**Obr. 11C**). Skupina 2 obsahuje 31 génov (25 použitých pre GO analýzu) a ich expresia bola podobná počas 60 minút po poranení medzi kontrolami a inhibovanými embryami. Po tomto čase začala u kontrolných embryí expresia týchto génov klesať. U embryí so zablokovanou produkciou NO ostala expresia týchto génov zvýšená, alebo naďalej rástla aj po 60 minúte po poranení (**Obr. 11D**). Táto skupina zdieľala GO termíny, ktoré súviseli s reguláciou transkripcie dôležitej pre delenie buniek, ich diferenciáciu a smrť (**Obr. 11E**). Posledná Skupina 3 obsahovala 136 génov (111 použitých pre GO analýzu), ktorých expresia bola znížená u kontrolných embryí, ale nebola zmenená po inhibícii produkcie NO (**Obr. 11F**). GO analýza ukázala, že tieto gény sú zodpovedné hlavne za reguláciu vývoja a reguláciu metabolických procesov (**Obr. 11G**).



Pre verifikáciu výsledkov získaných na základe RNA-Seq sme vybrali dva gény zo Skupiny 1 a Skupiny 2 pre detailnejšiu analýzu: *fos* a *lep*. Tieto gény mali minimálnu expresiu v neporanenom tkanive a rýchlu aktiváciu expresie po poranení (Obr. 12A, B). Výsledky sme verifikovali s využitím RT-qPCR (Obr. 12C, D) a *in situ* hybridizácie (Obr. 12E, F). Expresia *fos* bola zvýšená po poranení s maximom 30 minút po poranení u kontrolných embryí. Na druhej strane, embryá so zablokovanou produkciou NO mali zvýšenú expresiu *fos* aj v čase 30 až 90 minút po poranení (Obr. 12B, D). Pomocou *in situ* hybridizácie sme pozorovali minimálny signál pre *fos* u kontrolných embryí 60 minút po poranení a zvýšenú produkciu u embryí so zablokovanou produkciou NO (Obr. 12E, F). mRNA pre *lep* nebola detegovateľná pomocou RT-qPCR v neporanenom tkanive a nebola exprimovaná ani počas prvých 30 minút po poranení. *lep* mRNA bola detegovateľná až v 60 minúte a jej hladina expresie sa v čase zvyšovala. Naopak, u TRIM a MO embryí sme pozorovali signifikantne nižšiu expresiu *lep* (Obr. 12A, C).



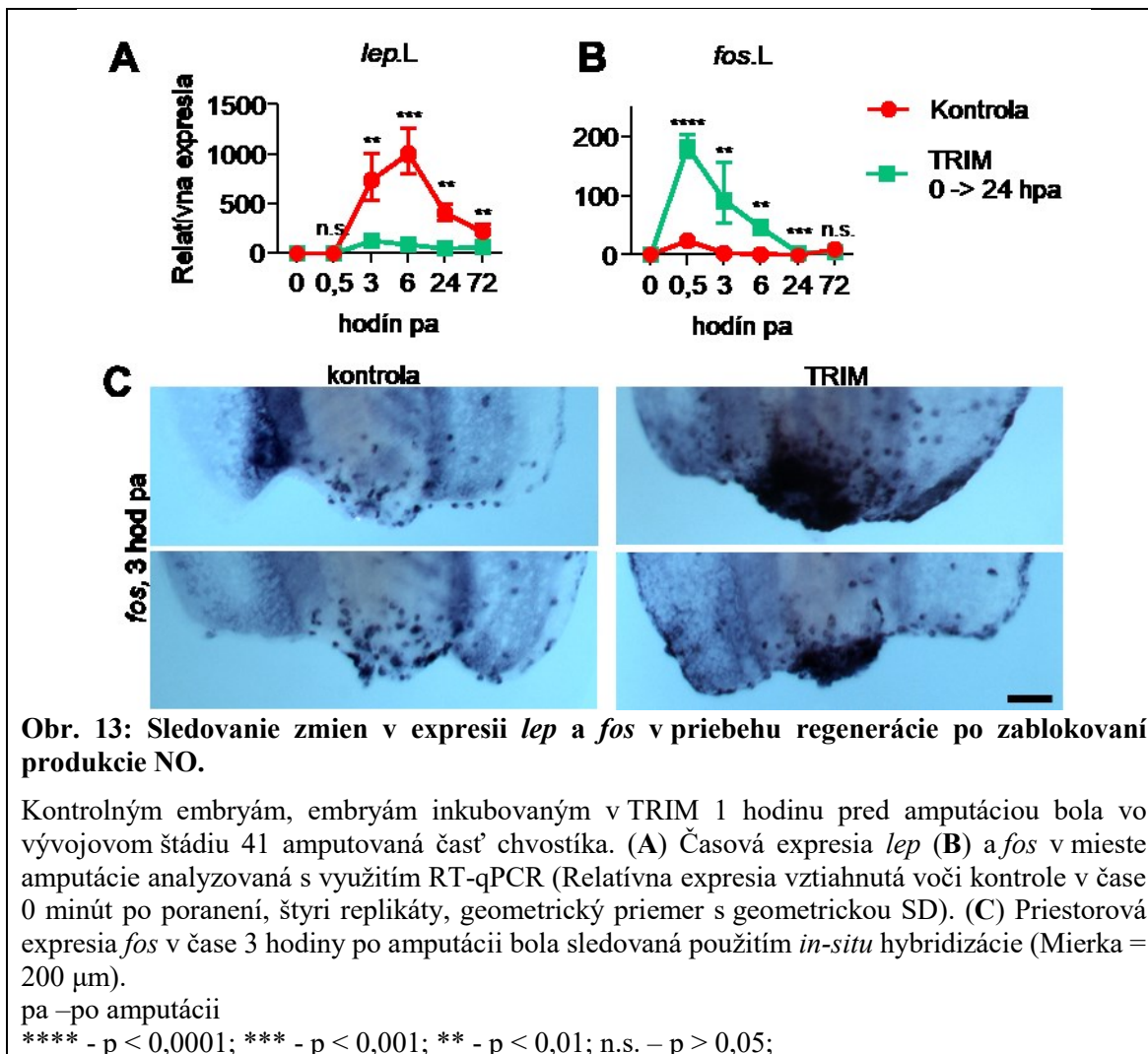
Obr. 12: Sledovanie zmien v expresii *lep* a *fos* počas embryonálneho hojenia po zablokovaní produkcie NO.

Výsledky z RNA-Seq pre (A) *lep*.L a (B) *fos*.L boli verifikované (C, D) zvlášť pre *nos1* a *nos3*-MO použitím RT-qPCR (Relatívna expresia vztiahnutá voči kontrole v čase 0 minút po poranení, tri replikáty, geometrický priemer s geometrickou SD, t-test z log₂ hodnôt relatívnej expresie medzi kontrolou v čase 120 minút po poranení a vzorkami so zablokovanou produkciou NO). (E) Priestorová analýza expresie *fos* 60 minút po poranení s využitím *in-situ* hybridizácie. Miesto poranenia je vyznačené hviezdíčkou (*) a priestor, kde je exprimovaný *fos* je ohraničený bielou čiarkovanou čiarou. (Mierka = 100 μm) (F) Intenzita modrého signálu okolo miesta poranenia. (8 replikátov na podmienku, jednofaktorová ANOVA s Dunnett testom)
pp –po poranení; RIU – „Relative intensity unit“, relatívna jednotka intenzity
**** - p < 0,0001; ** - p < 0,01; * - p < 0,05; n.s. – p > 0,05;

4.3.2. Zmeny v génovej expresii v priebehu regenerácie po zablokovaní produkcie NO

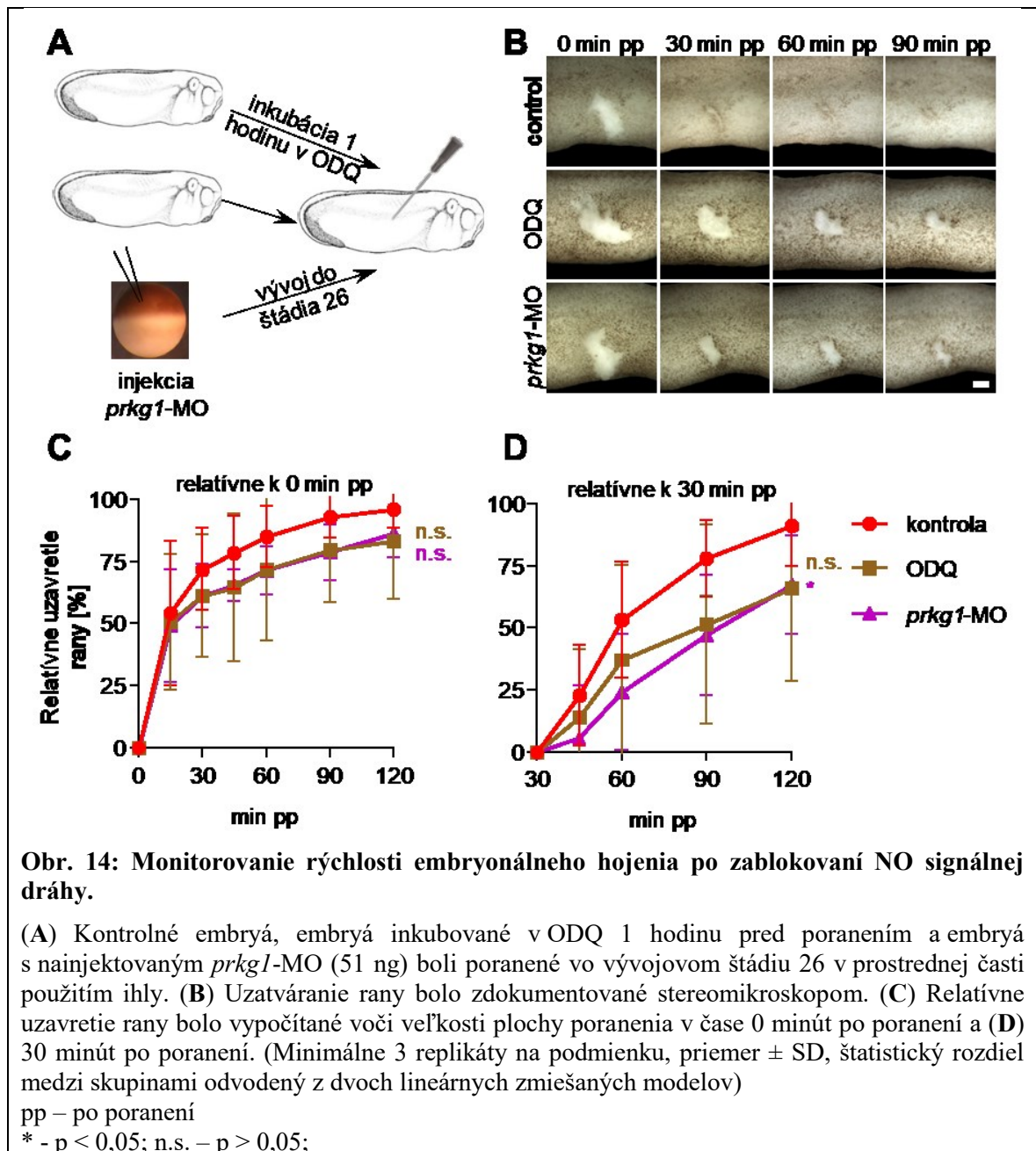
Výsledky z génovej expresie v priebehu hojenia sme porovnali s profilom génovej expresie v priebehu regenerácie. Génovú expresiu sme analyzovali u dvoch rovnakých génov: *lep* a *fos*. Podobne ako v priebehu hojenia, expresia *lep* začala u kontrolných embryí rásť 30 minút po amputácii a *lep* dosiahol maximálnu hladinu expresie *lep* 6 hodín po amputácii, kedy začala postupne klesať (Obr. 13A). Zablokovanie NO produkcie viedlo k signifikantnému zníženiu expresie *lep* v priebehu regenerácie.

Expresia *fos* v priebehu regenerácie kontrolných embryí mala podobný priebeh ako v prípade hojenia. Bezprostredne po amputácii začala expresia *fos* rásť, s maximom 30 minút po amputácii. K obnoveniu na fyziologické hodnoty došlo už 3 hodiny po amputácii (Obr. 13B). Zablokovanie produkcie NO viedlo k 10-násobne vyššej hladine expresie *fos* 30 minút po amputácii pri porovnaní s kontrolou. Po dosiahnutí maxima začala expresia *fos* klesať, avšak na rozdiel od kontrol, k obnoveniu na fyziologickú hladinu došlo až po viac ako 24 hodinách po amputácii. Pomocou *in situ* hybridizácie sme pozorovali, že zatiaľ čo expresia *fos* 3 hodiny po amputácii u kontrolných embryí je špecifická len pre niekoľko buniek v špičke regenerujúceho sa chvostíka (Obr. 13C), tak pôsobenie TRIM inhibítora viedlo k pretrvávajúcej expresii *fos* v celej špičke.



4.4. Vplyv NO signálnej dráhy na procesy embryonálneho hojenia.

NO môže reagovať cez dve základné signálne dráhy: cGMP-závislú a cGMP-nezávislú dráhu (**Obr. 3**). Aby sme určili, cez ktorú dráhu reguluje NO embryonálne hojenie, tak sme sledovali pôsobenie dvoch hlavných zástupcov cGMP-závislej dráhy (sGC a PRKG1) na proces embryonálneho hojenia. Funkciu sGC sme zablockovali pomocou chemického inhibítora ODQ, zatiaľ čo aktivita PRKG1 bola zablockovaná použitím *prkg1*-MO (**Obr. 14A**). Zatváranie rany sme porovnali s kontrolnými embryami (**Obr. 14B**). Proces zatvárania rany bol pomalší v embryách so zablockovanou aktivitou sGC a PRKG1, avšak tento efekt nebol signifikantný (**Obr. 14C**). V priebehu druhej fázy hojenia (30 minút po poranení) bol efekt spomalenia zatvárania rany výraznejší (**Obr. 14D**).



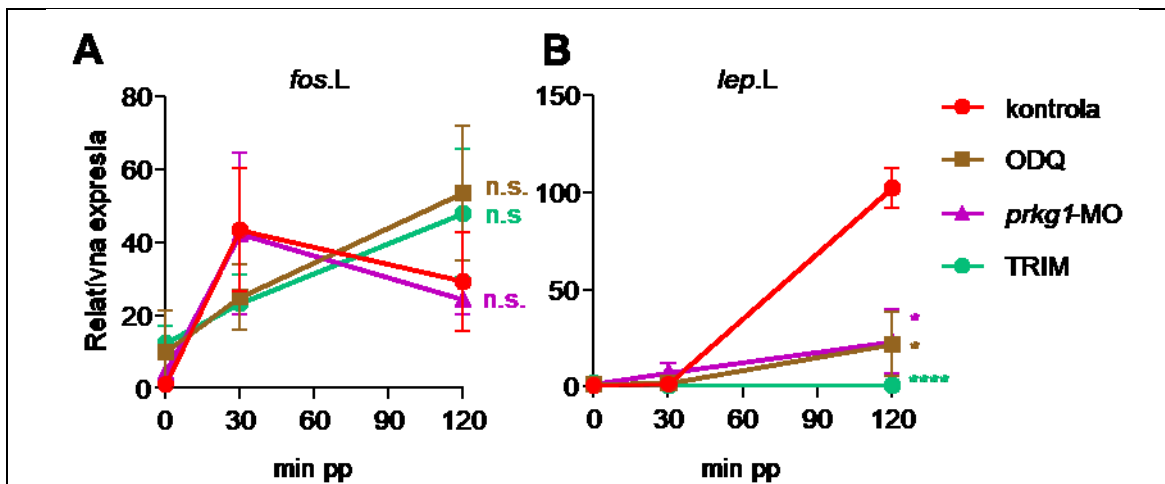
Obr. 14: Monitorovanie rýchlosti embryonálneho hojenia po zablokovaní NO signálnej dráhy.

(A) Kontrolné embryá, embryá inkubované v ODQ 1 hodinu pred poranením a embryá s nainjektovaným *prkg1*-MO (51 ng) boli poranené vo vývojovom štádiu 26 v prostrednej časti použitím ihly. (B) Uzatváranie rany bolo zdokumentované stereomikroskopom. (C) Relatívne uzavretie rany bolo vypočítané voči veľkosti plochy poranenia v čase 0 minút po poranení a (D) 30 minút po poranení. (Minimálne 3 replikáty na podmienku, priemer \pm SD, štatistický rozdiel medzi skupinami odvodený z dvoch lineárnych zmiešaných modelov)

pp – po poranení

* - $p < 0,05$; n.s. – $p > 0,05$;

Vplyv zablokovania aktivity cGMP-sigálnej dráhy v priebehu embryonálneho hojenia sme sledovali aj na úrovni génovej expsie vybraných génov: *fos* a *lep*. Expesia *fos* bola podobná medzi kontrolnými a *prkg1*-MO embryami, zatiaľ čo ODQ embryá mali podobne abnormálnu expresiu *fos* ako TRIM embryá (Obr. 15A). Expesia *lep* bola znížená takmer 80 krát v oboch ODQ a aj *prkg1* embryách v porovnaní s kontrolnými embryami v čase 120 minút po poranení (Obr. 15B).



Obr. 15: Sledovanie zmien v expresii *fos* a *lep* v priebehu embryonálneho hojenia po zablokovaní NO signálnej dráhy.

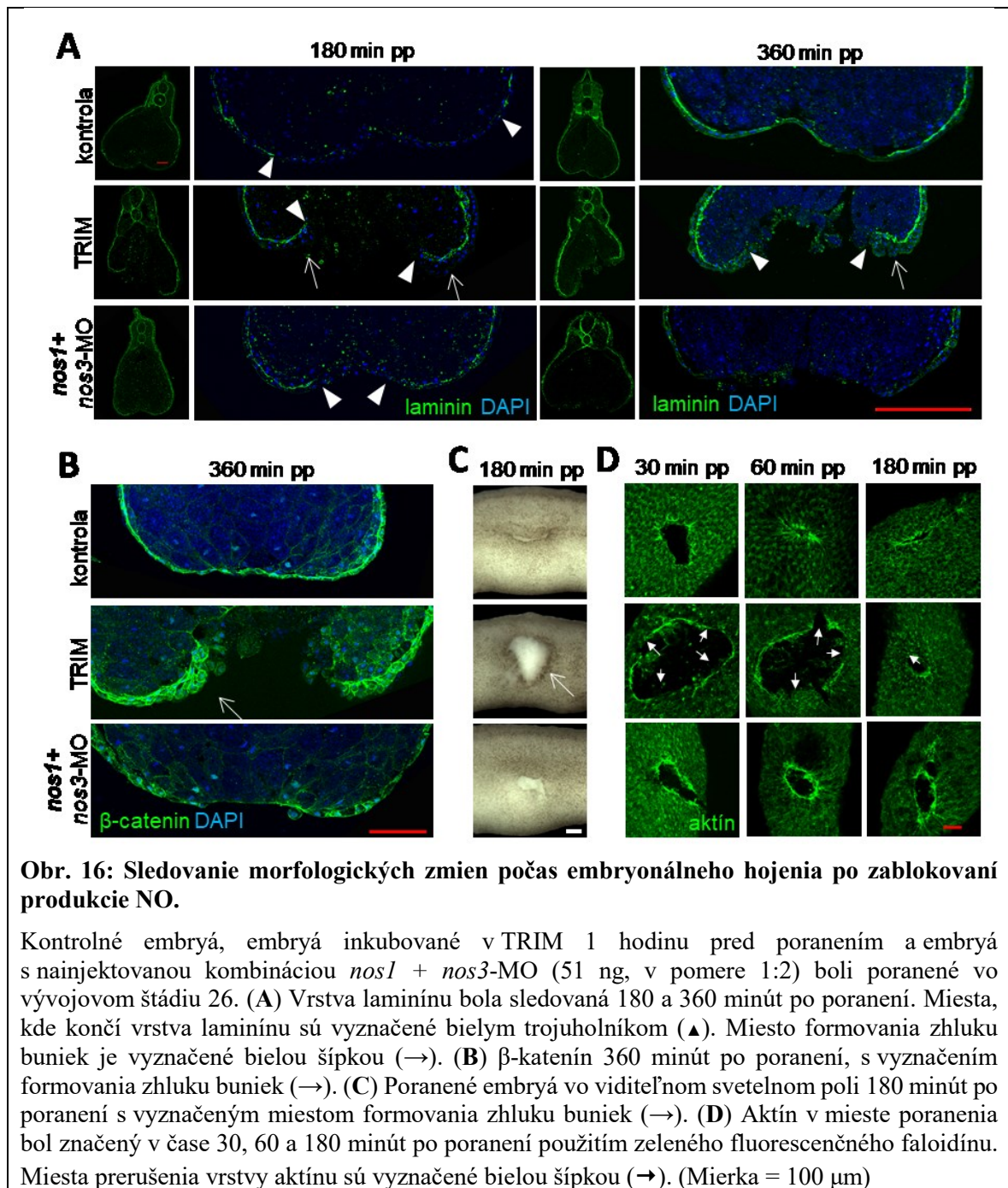
Kontrolné embryá, embryá inkubované v ODQ 1 hodinu pred poranením a embryá s nainjektovaným *prkg1*-MO (51 ng) boli poranené vo vývojovom štádiu 26 v prostrednej časti použitím pinzety. (A, B) Časová expresia *fos* a *lep* v mieste rany bola analyzovaná s využitím RT-qPCR (Relatívna expresia vztiahnutá voči kontrole v čase 0 minút po poranení, tri replikáty, geometrický priemer s geometrickou SD, t-test z log2 hodnôt relatívnej expresie medzi kontrolou v čase 120 minút po poranení a vzorkami so zablokovanou produkciou NO).

pp –po poranení

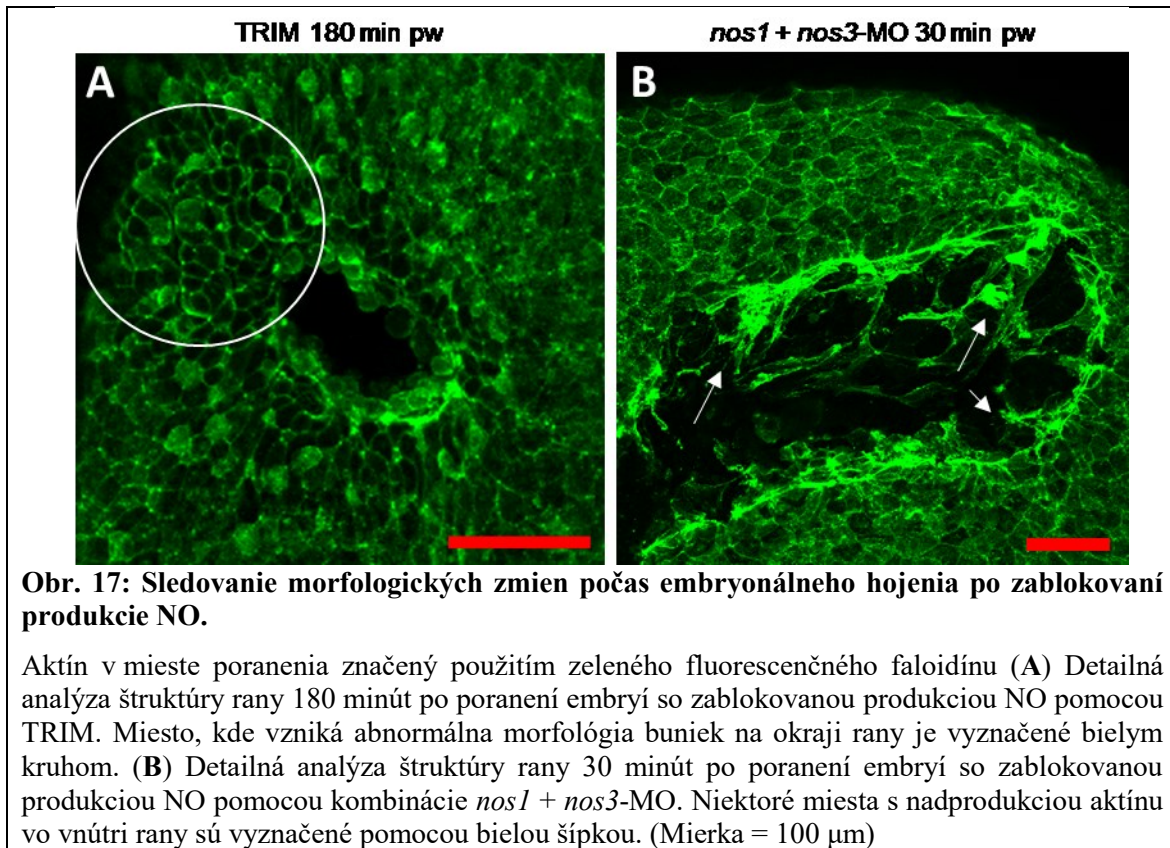
**** - $p < 0,0001$; * - $p < 0,05$; n.s. – $p > 0,05$;

4.5. Zmeny v štruktúre miesta poranenia v priebehu embryonálneho hojenia vplyvom zablokovania produkcie NO

V ďalšom kroku sme sa zamerali na štúdium morfológických zmien v priebehu embryonálneho hojenia po zablokovaní produkcie NO. Ako prvé sme sledovali zmeny v štruktúre bazálnej membrány 180 a 360 minút po poranení pomocou značenia laminínu (Obr. 16A). Kontrolné embryá mali oslabenú vrstvu laminínu 180 minút po poranení (keď bolo poranenie už úplne uzavreté), avšak tá sa obnovila 360 minút po poranení. Podobne ako u kontrol, laminínová vrstva bola oslabená u MO embryí 180 minút po poranení, ale jej obnovenie po 360 minútách po poranení sme nepozorovali. Na druhej strane, embryá s akútnym zablokovaním NO produkcie pomocou TRIM mali minimálnu produkciu laminínu v mieste rany a nepoškodenú vrstvu laminínu na okrajoch rany. Navyše, u TRIM embryí so značeným β -katenínom sme pozorovali akumuláciu buniek na okraji rany. Tieto bunky vytvárali bližšie nešpecifikovaný zhluk buniek, ktorý pravdepodobne môže brániť v uzatváraní rany (Obr. 16B). Tieto naakumulované bunky sme pozorovali aj ako tmavý okraj poranenia v okolí rany pri použití svetelnej mikroskopie (Obr. 16C).



Dobre popísaným procesom v priebehu hojenia je formácia aktíno-myozinového prstenca v okolí rany. Tento proces sme sledovali vizualizáciou aktínu použitím fluorescenčne značeného faloidínu (Obr. 16D). Akútne zablokovanie produkcie NO síce viedlo ku formovaniu aktínového prstenca v okolí rany, avšak s mnohými prerušeniami. Taktiež, morfológia buniek v okolí poranenia bola abnormálna (Obr. 17A). Chronické zablokovanie produkcie NO naopak viedlo k nadprodukcii aktínu v porovnaní s kontrolou. Okrem toho boli vo vnútri rany formované ďalšie komplexné aktínové štruktúry (Obr. 17B).

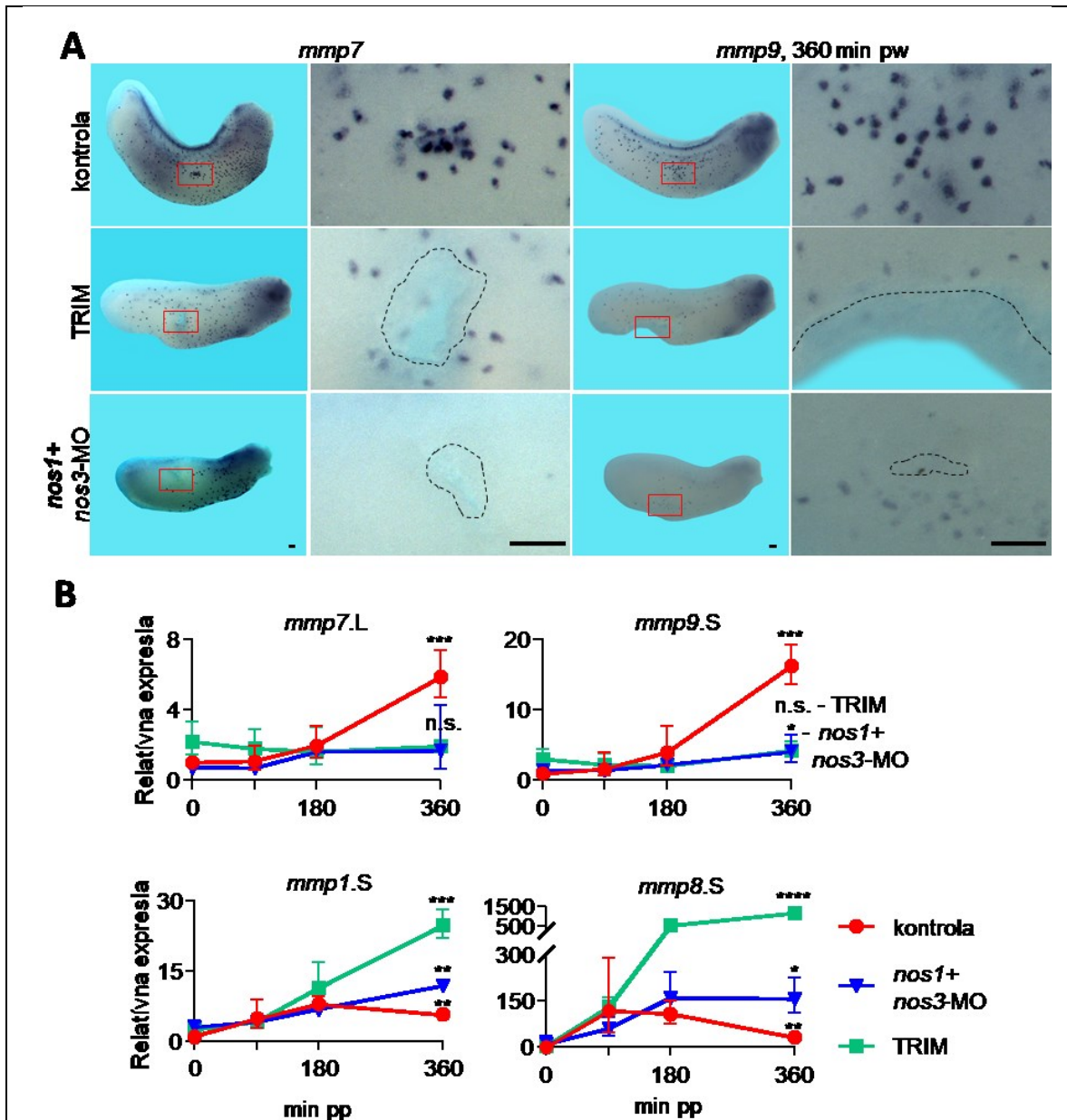


4.6. Vplyv NO na migráciu buniek imunitného systému do miesta poranenia

4.6.1. Vplyv NO na migráciu buniek imunitného systému v priebehu embryonálneho hojenia

Zmeny v štruktúre bazálnej membrány sú spojené s produkciou a aktivitou MMP – enzýmov, ktoré sú zodpovedné za remodeláciu. Na základe výsledkov z RNA sekvenovania sme vybrali 4 (*mmp1*, *mmp7*, *mmp8*, *mmp9*) najzaujímavejšie *mmp* gény a sledovali sme ich priestorovú a časovú expresiu. Navyše, *mmp7* a *mmp9* sú taktiež markermi pre migrujúce progenitory myeloidných buniek (Agricola, et al., 2016; Briggs, et al., 2018; Harrison, et al., 2004; Tomlinson, et al., 2008) a *mmp1* a *mmp8* sú známe regulátory migrácie buniek počas hojenia (Caley, et al., 2015). Zablokovanie produkcie NO viedlo k zníženiu celkového počtu *mmp7* a *mmp9* pozitívnych buniek ako aj zníženie ich migrácie (Obr. 18A). Podobne výsledky sme získali pomocou RT-qPCR, kedy sa u kontrolných embryí expresia *mmp7* a *mmp9* začala zvyšovať 180 minút po poranení, zatiaľ čo zablokovanie produkcie NO viedlo k nezmenenej expresii týchto génov počas sledovanej doby hojenia (Obr. 18B). Na druhej strane, u expresie *mmp1* a *mmp8* sme pomocou RT-qPCR pozorovali opačný efekt (Obr. 18B). Expresia týchto génov bola zvýšená 90/180 minút po poranení – ako kontrol,

tak aj embryí so zablokovanou produkciou NO. Avšak, u kontrolných embryí začala expresia týchto génov po 180 minútach klesať, zatiaľ čo u embryí so zablokovanou produkciou NO ostala zvýšená, alebo pokračovala v raste.



Obr. 18: Sledovanie zmien v expresii *matrix metaloproteináz* počas embryonálneho hojenia po zablokovaní produkcie NO.

Kontrolné embryá, embryá inkubované v TRIM 1 hodinu pred poranením a embryá s nainjektovanou kombináciou *nos1* + *nos3-MO* (51 ng, v pomere 1:2) boli poranené vo vývojovom štádiu 26. (A) Priestorová expresia *mmp7* a *mmp9* v čase 360 minút po poranení bola sledovaná použitím *in-situ* hybridizácie (Mierka = 500 μ m). (B) Časová expresia *mmp7*, *mmp9*, *mmp1*, a *mmp8* v mieste rany bola analyzovaná s využitím RT-qPCR (Relatívna expresia vztiahnutá voči kontrole v čase 0 minút po poranení, tri replikáty, geometrický priemer s geometrickou SD, t-test z log₂ hodnôt relatívnej expresie medzi kontrolou v čase 360 minút po poranení a vzorkami so zablokovanou produkciou NO).

pp – poranení; **** - $p < 0,0001$; *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; n.s. – $p > 0,05$;

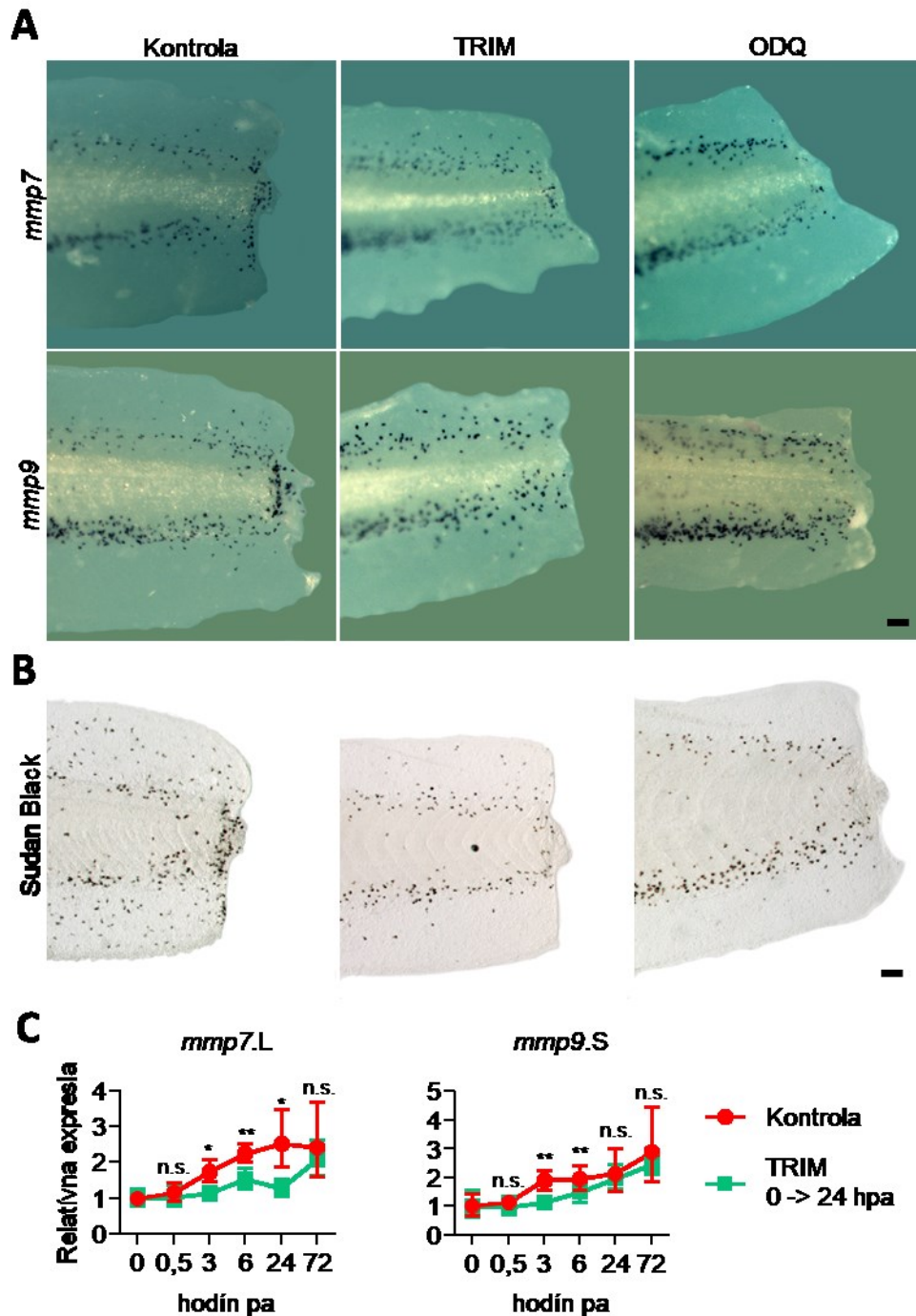
4.6.2. Vplyv NO na migráciu buniek imunitného systému v priebehu regenerácie

Reguláciu migrácie buniek vplyvom produkcie NO sme sledovali aj v priebehu regenerácie. Sledovali sme priestorovú expresiu *mmp7* a *mmp9* pomocou *in situ* hybridizácie 3 hodiny po amputácii chvostíka. V rovnakom čase sme sledovali aj priestorové zastúpenie buniek zápalu (neutrofilov) farbením použitím Sudan Black B. Taktiež sme analyzovali časovú zmenu expresie *mmp7* a *mmp9* pomocou RT-qPCR.

U kontrolných embryí sme sledovali akumuláciu buniek imunitného systému v mieste amputácie/regenerácie (**Obr. 19A, B**). Zablokovanie NO signálnej dráhy viedlo k zablokovaniu tejto migrácie. Pomocou RT-qPCR sme pozorovali nižšiu expresiu *mmp7* ako aj *mmp9* po zablokovaní produkcie NO 3 a 6 hodín po amputácii.

4.7. Overenie vzťahu medzi produkciou NO a aktivitou Leptínu počas embryonálneho hojenia

V priebehu hojenia ako aj regenerácie sme pozorovali zablokovanie aktivácie expresie *lep* pri inhibícii produkcie NO (**Obr. 12A,C**). Na druhej strane, Lep je známy ako aktivátor produkcie NO (**Obr. 20A**) (Mehebik, et al., 2005). Preto sme sa zamerali na sledovanie dôležitosti *lep* pre proces hojenia. Na zablokovanie aktivity *lep* sme použili *lep*-MO. Použitie *lep*-MO viedlo k zníženiu rýchlosti zatvárania poranenia (**Obr. 20B,C**). Ďalej sme sledovali zmeny v génovej expresii počas hojenia po použití *lep*-MO. Najprv, na to, aby sme potvrdili špecificitu aktivity *lep*-MO sme sledovali expresiu *socs3*. Expresia *socs3* je zvýšená po aktivácii LepR (Bjorbaek, et al., 1998). My sme nepozorovali zmeny v expresii *socs3* po použití *lep*-MO (**Obr. 20D**), čo je potvrdenie účinnosti *lep*-MO. Ďalej sme sledovali zmeny v expresii *fos*. Expresia *fos* bola podobná u oboch *lep*-MO a aj *nos1 + nos3*-MO embryí (**Obr. 20E**).

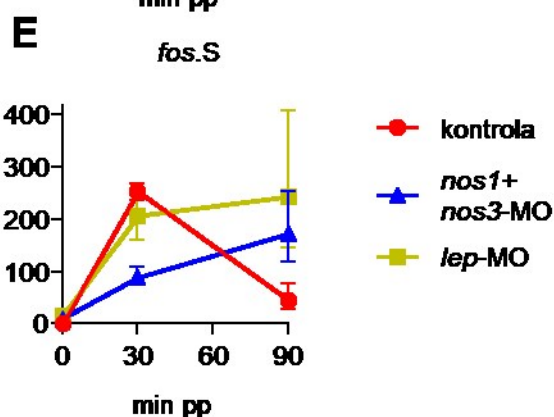
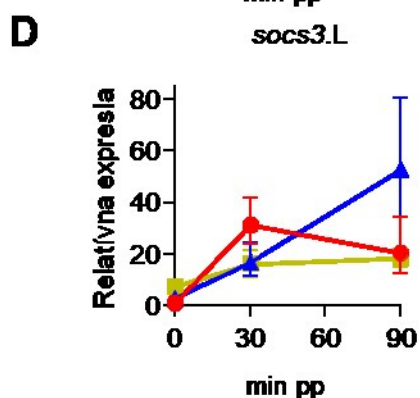
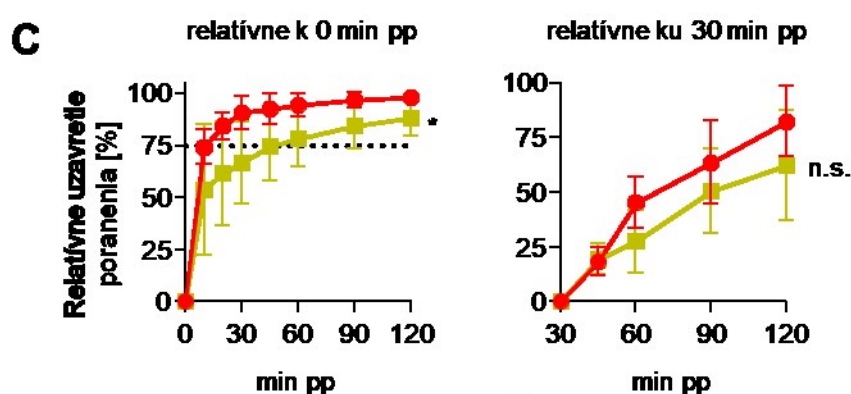
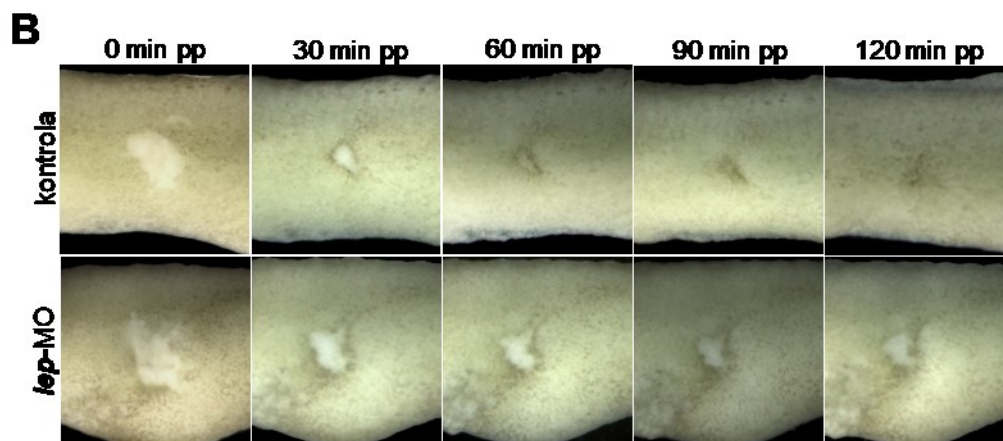
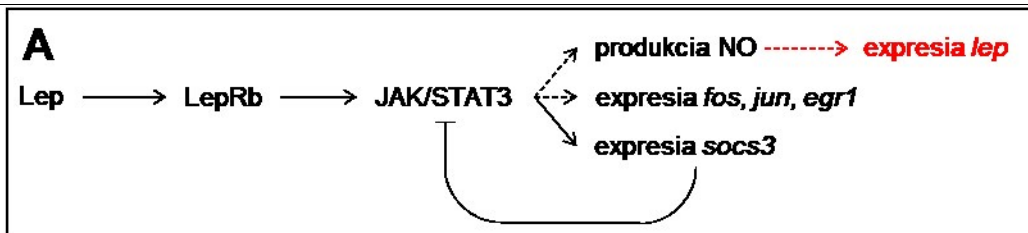


Obr. 19: Sledovanie zmien v migrácii buniek imunitného systému v priebehu regenerácie po zablokovaní produkcie NO.

Kontrolným embryám, embryám inkubovaným v TRIM alebo ODQ 1 hodinu pred amputáciou bola vo vývojovom štádiu 41 amputovaná časť chvostíka. (A) Priestorová expresia *mmp7* a *mmp9* v čase 3 hodiny po amputácii bola sledovaná použitím *in-situ* hybridizácie (B) Analýza zápalu pomocou Sudan Black B 3 hodiny po amputácii (Mierka = 500 μ m). (C) Časová expresia *mmp7* a *mmp9* v mieste amputácie s využitím RT-qPCR (Relatívna expresia vztiahnutá voči kontrole v čase 0 hodín po amputácii, štyri replikáty, geometrický priemer s geometrickou SD, t-test z log2 hodnôt relatívnej expresie medzi kontrolou a TRIM).

pp –po poranení

** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; n.s. – $p > 0,05$;

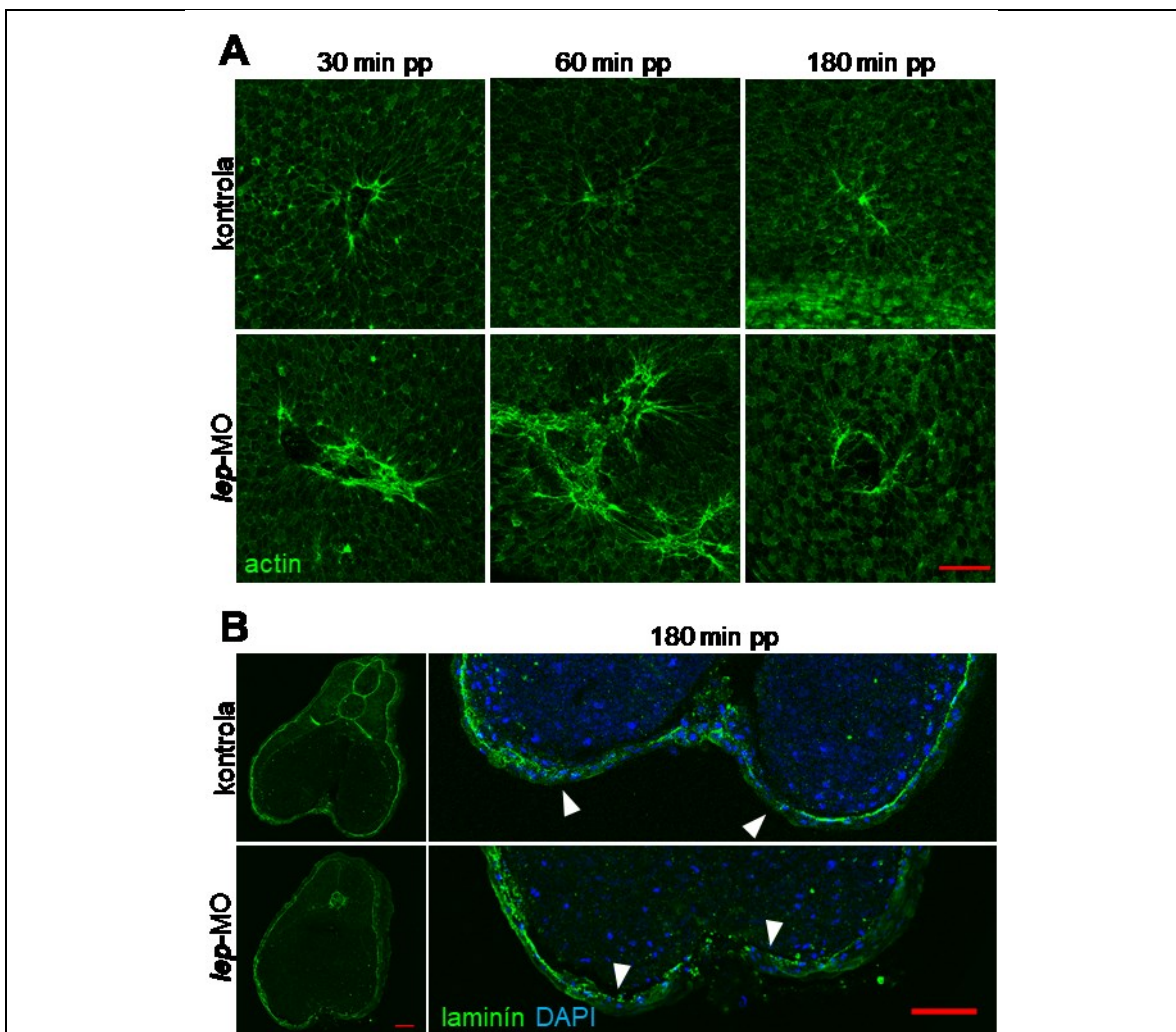


Obr. 20: Monitorovanie embryonálneho hojenia pri poškodení funkcie *lep*.

(A) Obecne, Leptín je popisovaný ako regulátor produkcie NO, avšak v našich analýzach sme pozorovali, že zablokovanie produkcie NO vedie k poklesu expresie *lep*. (B) Kontrolné embryá a embryá s nainjektovaným *lep*-MO (5 ng) boli poranené vo vývojovom štádiu 26. Uzatváranie rany bolo zdokumentované stereomikroskopom. (C) Relatívne uzavretie rany bolo vypočítané voči veľkosti plochy poranenia v čase 0 minút po poranení a (D) 30 minút po poranení. (4 replikáty na podmienku, priemer \pm SD, štatistický rozdiel medzi skupinami odvodený z dvoch lineárnych zmiešaných modelov). (D, E) Časová expresia *socs3* a *fos* v mieste rany analyzovaná s využitím

RT-qPCR (Relatívna expresia vzťahnutá voči kontrole v čase 0 minút po poranení, tri replikáty, geometrický priemer s geometrickou SD).
 pp – po poranení
 * - $p < 0,05$; n.s. – $p > 0,05$;

Na overenie dôležitosti *lep* pre proces hojenia sme študovali aktín a laminín v mieste rany pomocou imunohistochemických metód. Pozorovali sme, že strata funkcie *lep* vedie k extrémnej formácii aktínových vlákien v mieste rany 60 minút po poranení (**Obr. 21A**) a sledovali sme minimálnu produkciu laminínu v mieste rany 180 minút po poranení (**Obr. 21B**). Celkovo sme ukázali, že *lep* nie je dôležitý len pre správny proces hojenia, ale strata funkcie *lep* vedie k podobnému fenotypu ako zablokovanie produkcie NO.



Obr. 21: Sledovanie morfológických zmien počas embryonálneho hojenia pri poškodení funkcie *lep*.

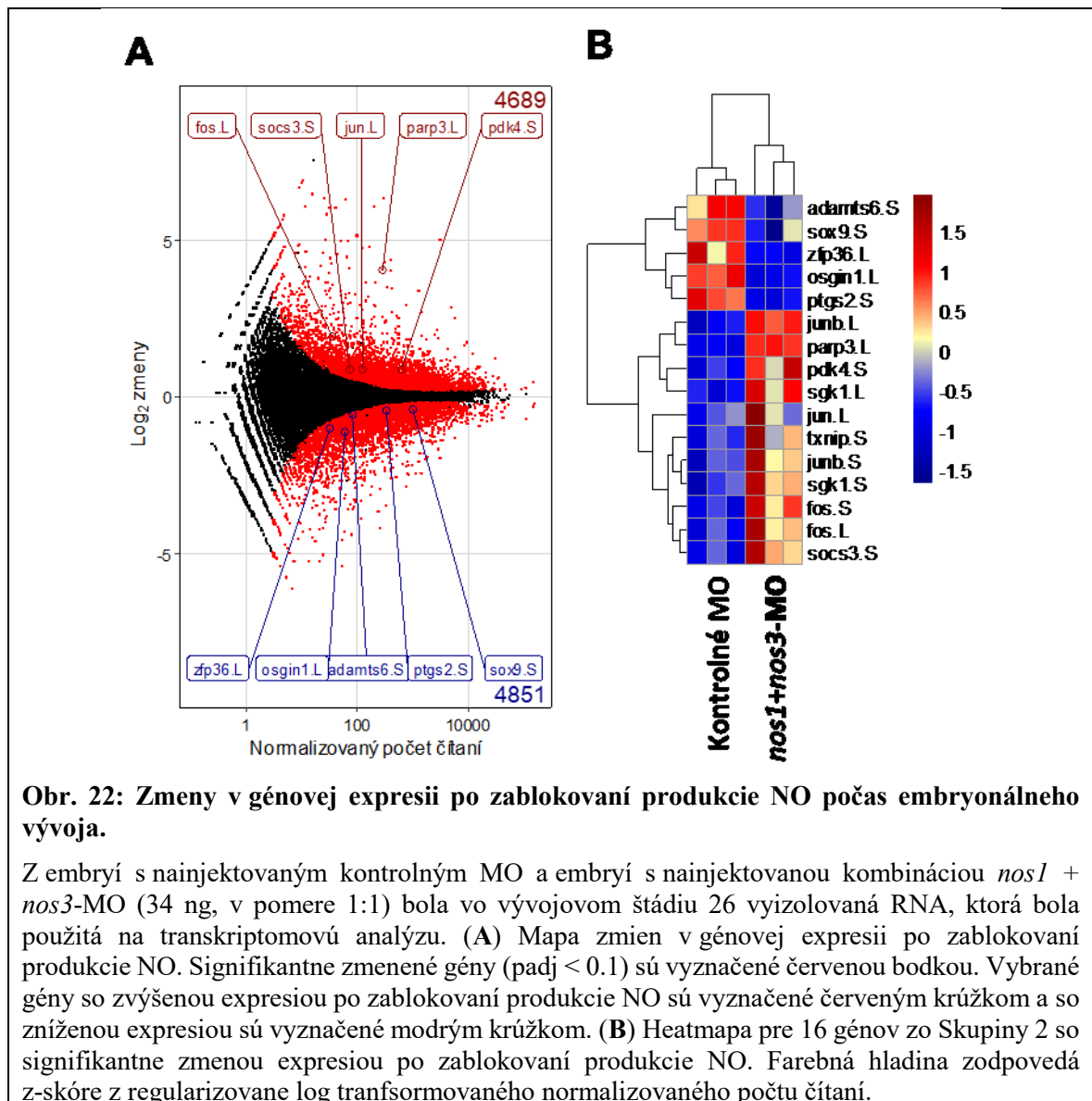
Kontrolné embryá a embryá s nainjektovaným *lep*-MO (5 ng) boli poranené vo vývojovom štádiu 26. (A) Aktín v mieste poranenia bol značený v čase 30, 60 a 180 minút po poranení použitím zeleného fluorescenčného faloidínu. (B) Vrstva laminínu bola sledovaná 180 minút po poranení. Miesta, kde končí vrstva laminínu sú vyznačené bielym trojuholníkom (▲). (Mierka = 100 μ m)

4.8. Vplyv NO na expresiu génov reagujúcich na stres

4.8.1. Zmeny v expresii génov reagujúcich na stres počas embryonálneho vývoja

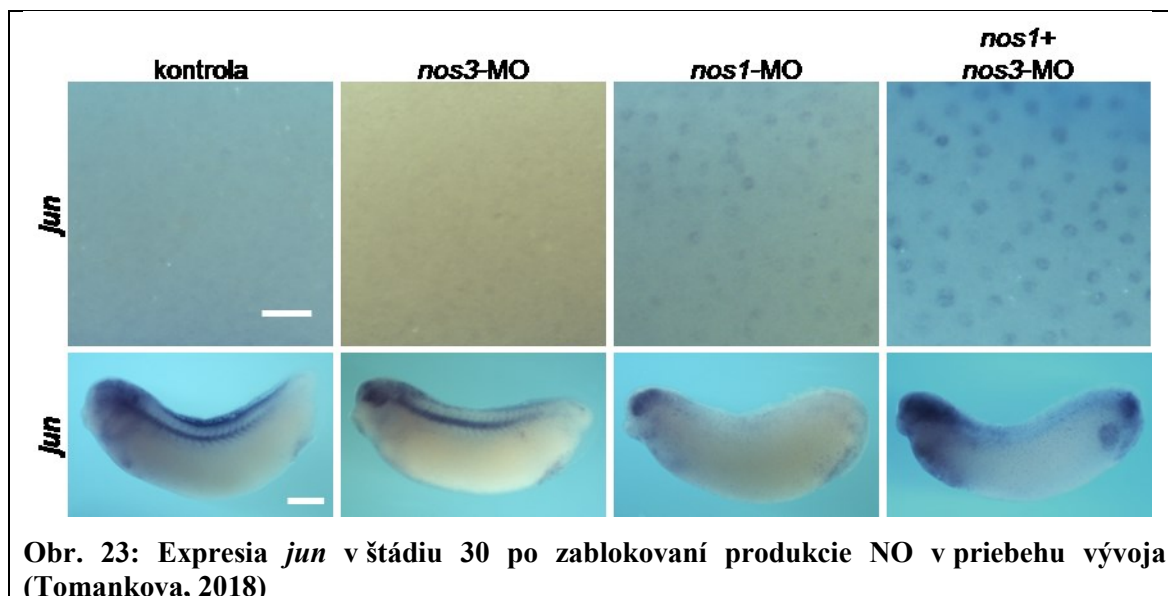
V ďalšom kroku sme sa zamerali na úlohu génov zo Skupiny 2 (**Obr. 11D**), ktoré v ďalšej časti nazývame ako gény reagujúce na stres. Sledovali sme úlohu NO v priebehu embryonálneho vývoja. Porovnali sme rozdiely v génovej expresii u embryí so zablokovanou produkciou NO pomocou kombinácie *nos1* + *nos3*-MO v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Celkovo sme identifikovali 9540 génov, so signifikantne zmenenou expresiou ($p < 0,1$, **Obr. 22A**), z čoho 4689 génov malo zvýšenú expresiu po zablokovaní produkcie NO. Detailnejšia analýza ukázala, že medzi tieto gény patria napríklad aj gény z tzv. skupiny „Immediate-early genes“ (IEGs, napr. *fos*, *jun*). Okrem iného, gény patriace medzi IEGs patria aj medzi gény reagujúce na stres, ktorých expresia bola kontinuálne zvýšená aj v priebehu hojenia po zablokovaní produkcie NO (**Obr. 11D**). Porovnanie expresie 29 génov (2 gény anotované len ako Xelaev..., neboli použité pre analýzu) zo Skupiny 2 s expresiou u embryí so zablokovanou produkciou NO v priebehu vývoja ukázala, že 16 z týchto génov malo signifikantne zmenenú expresiu, pričom u 11 z nich bola zvýšená (**Obr. 22B**). Niektorý z týchto zástupcov patria aj medzi tzv. onkogény (napr. *fos*, *jun*, *parp3*).

Gény ovplyvnené NO v priebehu vývoja sú spojené aj s vývojom a funkciou pokožky (Tomankova, et al., 2017). V rámci štúdia úlohy NO v priebehu embryonálneho vývoja sme pozorovali pomocou *in situ* hybridizácie, že *jun* má zvýšené zastúpenie v špecifických bunkách epidermis (**Obr. 23**). Medzi gény, ktorých expresia bola zablokovaná v priebehu vývoja po zablokovaní produkcie NO patria *kolagény*, *keratíny* a *mmp*, ktoré sú súbežne dôležité aj pre proces hojenia (Tomankova, et al., 2017).



Obr. 22: Zmeny v génovej expresii po zablokovaní produkcie NO počas embryonálneho vývoja.

Z embryí s nainjektovaným kontrolným MO a embryí s nainjektovanou kombináciou *nos1* + *nos3*-MO (34 ng, v pomere 1:1) bola vo vývojovom štádiu 26 vyizolovaná RNA, ktorá bola použitá na transkriptomovú analýzu. (A) Mapa zmien v génovej expresii po zablokovaní produkcie NO. Signifikantne zmenené gény ($padj < 0.1$) sú vyznačené červenou bodkou. Vybrané gény so zvýšenou expresiou po zablokovaní produkcie NO sú vyznačené červeným krúžkom a so zníženou expresiou sú vyznačené modrým krúžkom. (B) Heatmapa pre 16 génov zo Skupiny 2 so signifikantne zmenou expresiou po zablokovaní produkcie NO. Farebná hladina zodpovedá z-skóre z regularizovane log transformovaného normalizovaného počtu čítaní.

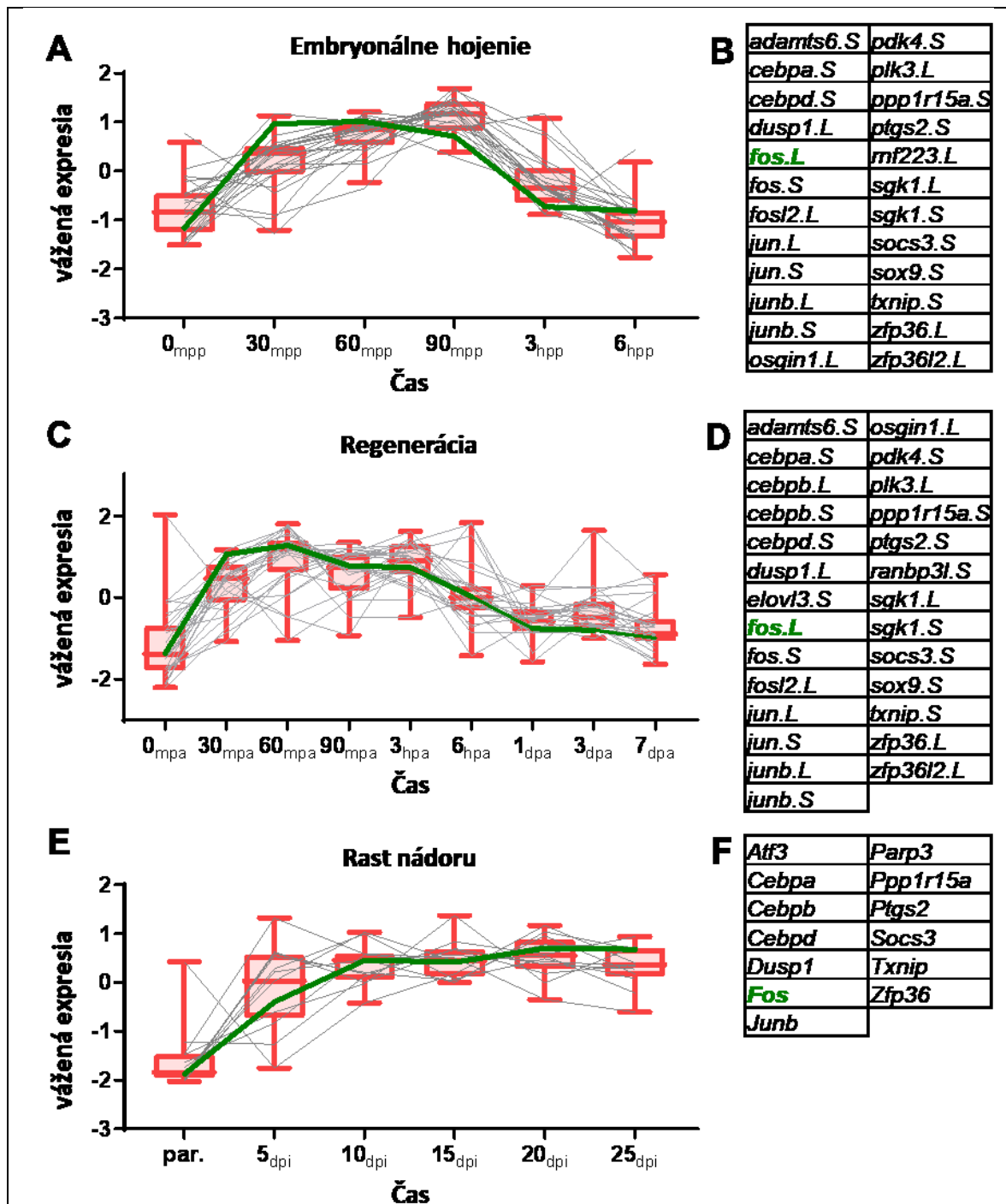


Obr. 23: Expresia *jun* v štádiu 30 po zablokovaní produkcie NO v priebehu vývoja (Tomankova, 2018)

4.8.2. Zmeny v expresii génov reagujúcich na stres počas embryonálneho hojenia, regenerácie a rastu nádoru.

V ďalšom kroku sme porovnali priebeh expresie génov reagujúcich na stres počas embryonálneho hojenia, regenerácie a rastu nádoru. Expresia 24 týchto génov (Obr. 24B) bola signifikantne zmenená počas embryonálneho hojenia s maximálnou expresiou medzi 30-90 minútov po poranení. Hladina ich expresie bola obnovená na pôvodnú hladinu 3 hodiny po poranení (Obr. 24A). Podobne, 27 z týchto génov (Obr. 24D) bolo signifikantne zmenených počas embryonálnej regenerácie, kedy maximálna expresia bola u väčšiny génov 60 minút po amputácii a hladina expresie sa obnovila už 1 deň po amputácii (Obr. 24C).

Pre sledovanie génovej expresie počas rastu nádoru sme použili líniu myšieho prsného karcinómu, ktorá bola subkutánne injektovaná do Balb/c myší. Zo skupiny 24 unikátnych génov (u niektorých génov pazúrnatky vodnej bola v Skupine 2 zastúpená aj L aj S varianta daného génu) bolo diferencially exprimovaných 13 z nich (Obr. 24F). Priebeh ich expresie v porovnaní s embryonálnym hojením, alebo regeneráciou bol rozdielny. Síce ich expresia na začiatku tiež rástla a dosiahla maximálnu hladinu 10 dní po injekcii, tak v ďalšom priebehu ostala i naďalej zvýšená (Obr. 24E). Práve takýto trend je podobný s expresiou týchto génov počas embryonálneho hojenia po zablokovaní produkcie NO (Obr. 11D).



Obr. 24: Zmeny v expresii génov reagujúcich na stres v priebehu embryonálneho hojenia, regenerácie a v priebehu rastu nádoru.

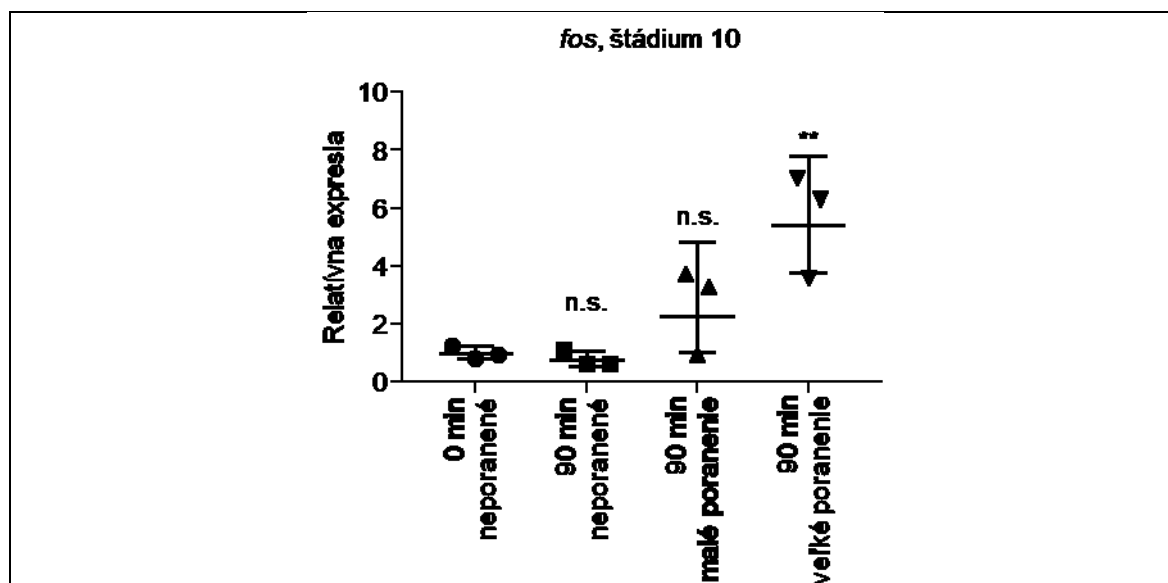
(A) Kontrolné embryá vo vývojom štádiu 26 boli poranené v prostrednej časti použitím pinzety. Následne bola pozbieraná poranená oblasť z piatich embryí, spojená a analyzovaná ako jeden biologický replikát. Zmeny v génovej expresii boli analyzované s využitím RNA-Seq (3 replikáty). Znázornený je časový profil génovej expresie pre (B) signifikantne zmenené gény zo Skupiny 2. (C) Kontrolným embryám vo vývojom štádiu 41 bola amputovaná časť chvostíka. Následne bola pozbieraná malá časť chvostíka v mieste amputácie z piatich embryí, spojená a analyzovaná ako jeden biologický replikát. Zmeny v génovej expresii boli analyzované s využitím RNA-Seq (3 replikáty). Znázornený je časový profil génovej expresie pre (D) signifikantne zmenené gény zo Skupiny 2. (E) Lúnia 4T1 myšieho prsného karcinómu bola subkutánne injektovaná do samíc Balb/c myší. V daných časoch bol pozbieraný nádor a zmena

expresie bola analyzovaná s využitím RNA-Seq. Zmena expresie bola porovnaná s parentálnou líniou 4T1 pred injekciou (minimálne 3 replikáty). Znázornený je časový profil génovej expresie pre (F) signifikantne zmenené gény zo Skupiny 2. Pre všetky grafy je znázornené z-skóre z regularizovane log transformovaného normalizovaného počtu čítaní.

mpp – minút po poranení; hpp – hodín po poranení; mpa – minút po amputácii; hpa – hodín po amputácii; dpa – dní po amputácii; dpi – dní po injekcii; par. – parentálna línia

4.8.3. Expresia génov reagujúcich na stres ako univerzálna odpoveď, ktorá negatívne ovplyvňuje výsledky RNA sekvenácie na úrovni jednej bunky

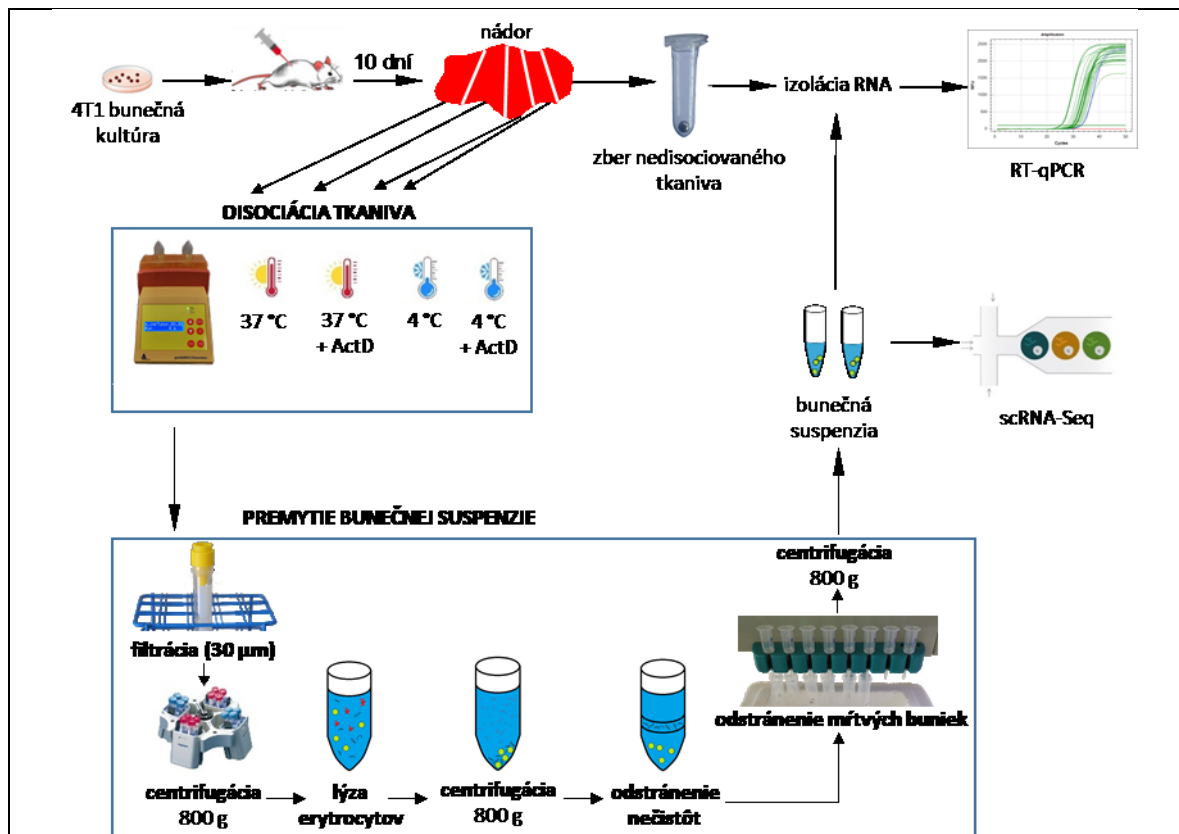
Expresia génov reagujúcich na stres je univerzálna odpoveď organizmov na stres a jedna z prvých reakcií (Bahrami & Drablos, 2016). Napríklad, zvýšenie expresie *fos* sme pozorovali už po poranení gastruly (Obr. 25). Navyše k aktivácii ich expresie dochádza aj pri disociácii tkaniva na jednotlivé bunky (van den Brink, et al., 2017). Pretože sledovanie expresie týchto génov je dôležité pre ďalšie pokračovanie štúdie, zamerali sme sa na optimalizáciu protokolu disociácie, tak aby sme zabránili zmenám v génovej expresii v priebehu disociácie a získali všetky bunkové typy obsiahnuté v analyzovanom tkanive. Porovnali sme efekt disociácie pri dvoch odlišných teplotách (37 °C a 4 °C) a efekt prítomnosti inhibítora génovej expresie (ActD). Výsledky sme porovnali použitím dvoch techník: RT-qPCR a scRNA-Seq (Obr. 26).



Obr. 25: Expresia *fos* po poranení embryí vo vývojovom štádiu 10.

Relatívna expresia vztiahnutá voči kontrole neporanených embryí, geometrický priemer s geometrickou SD, jednofaktorová ANOVA s Dunnett testom.

** - $p < 0,01$; n.s. - $p > 0,05$;



Obr. 26: Schéma analýzy vplyvu disociácie na zmenu géovej exprese.

Línia 4T1 myšieho prsného karcinómu bola subkutánne injektovaná do samíc Balb/c myši. 10 dní po injekcii bol pozbieraný nádor zo 6 myši, ktoré boli rozdelené na 5 častí. 6x1 časť (6 nádorov, 1 časť z každého nádoru) boli použité na disociáciu pri 4 rôznych podmienkach a 1 časť bola zamrazená priamo ako kontrola nedisociovaného nádoru. Po poslednej centrifugácii boli vzorky rozdelené na 2 časti a každá bola použitá na scRNA-Seq a RT-qPCR (2 replikáty pre RT-qPCR aj scRNA-Seq).

Prvý dôležitý parameter, ktorý sme sledovali bola celková viabilita. Vysoká viabilita je kritický parameter pre všetky scRNA-Seq metódy, pretože umierajúce bunky uvoľňujú do prostredia RNA, ktorá následne spôsobuje vysoké pozadie a znižuje presnosť analýzy. Minimálna viabilita pre scRNA-Seq metódy založené na droplet technológii je 70 % avšak minimálna doporučená viabilita je viac ako 90 %. Napriek tomu, že sme v protokole použili krok odstránenia mŕtvych buniek, sme nikdy nedosiahli viabilitu vyššiu ako 90 %. Avšak, v žiadnej z podmienok neklesla viabilita pod 70 % (Obr. 27A). Ďalším sledovaným parametrom bol celkový výťažok živých buniek po disociácii. Mnoho scRNA-Seq protokolov vyžaduje veľké množstvo buniek na začiatok a preto schopnosť získať veľké množstvo buniek je dôležitý parameter, obzvlášť pri práci s veľmi malými tkanivami. Disociácia pri nižšej teplote viedla k zníženiu celkového výťažku živých buniek (Obr. 27B).

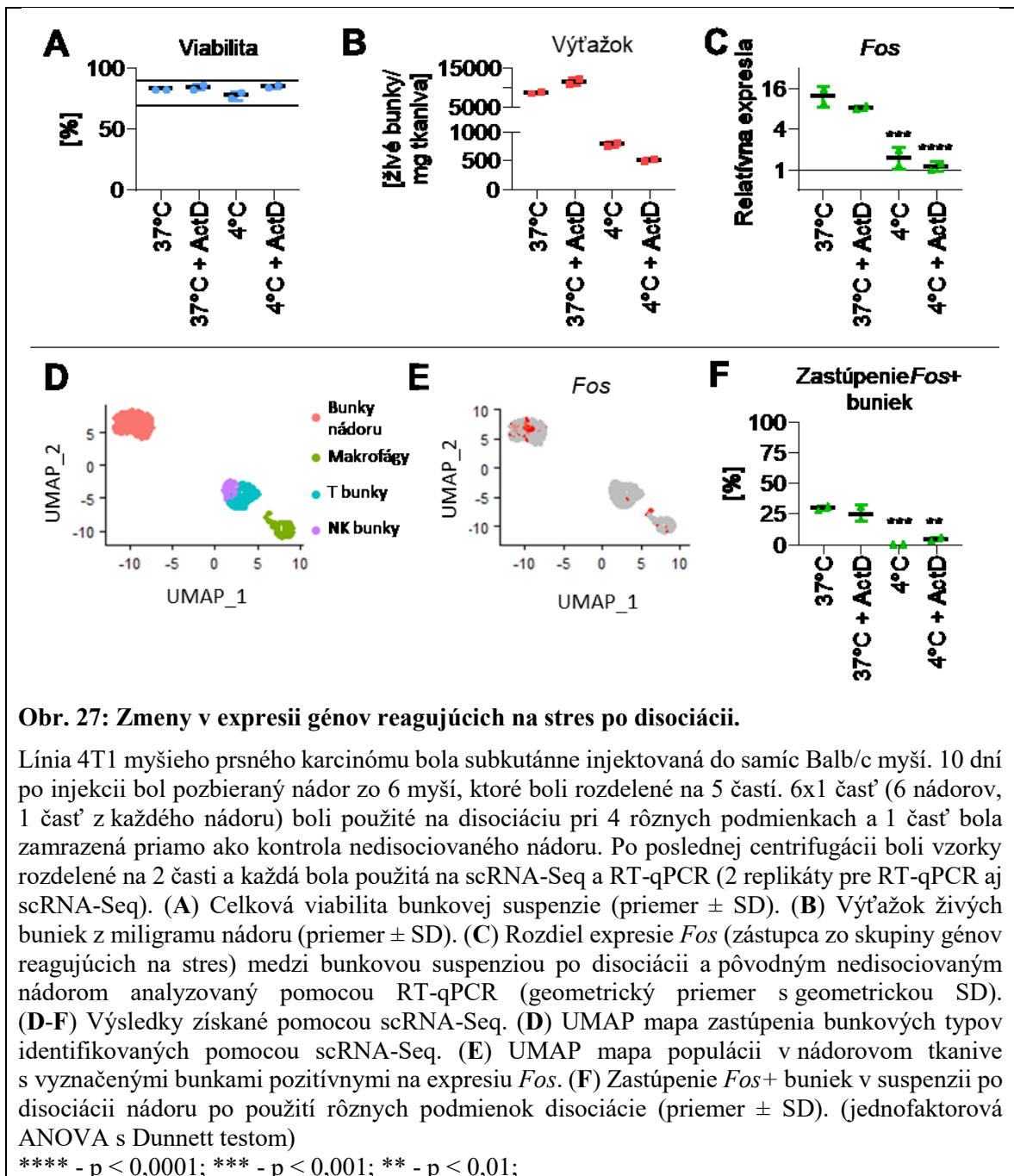
Napriek tomu, že nižšia teplota viedla k nižšiemu výťažku, dôležitým parametrom je zmena géovej exprese v priebehu disociácie. Na popis zmien aktivácie exprese génov

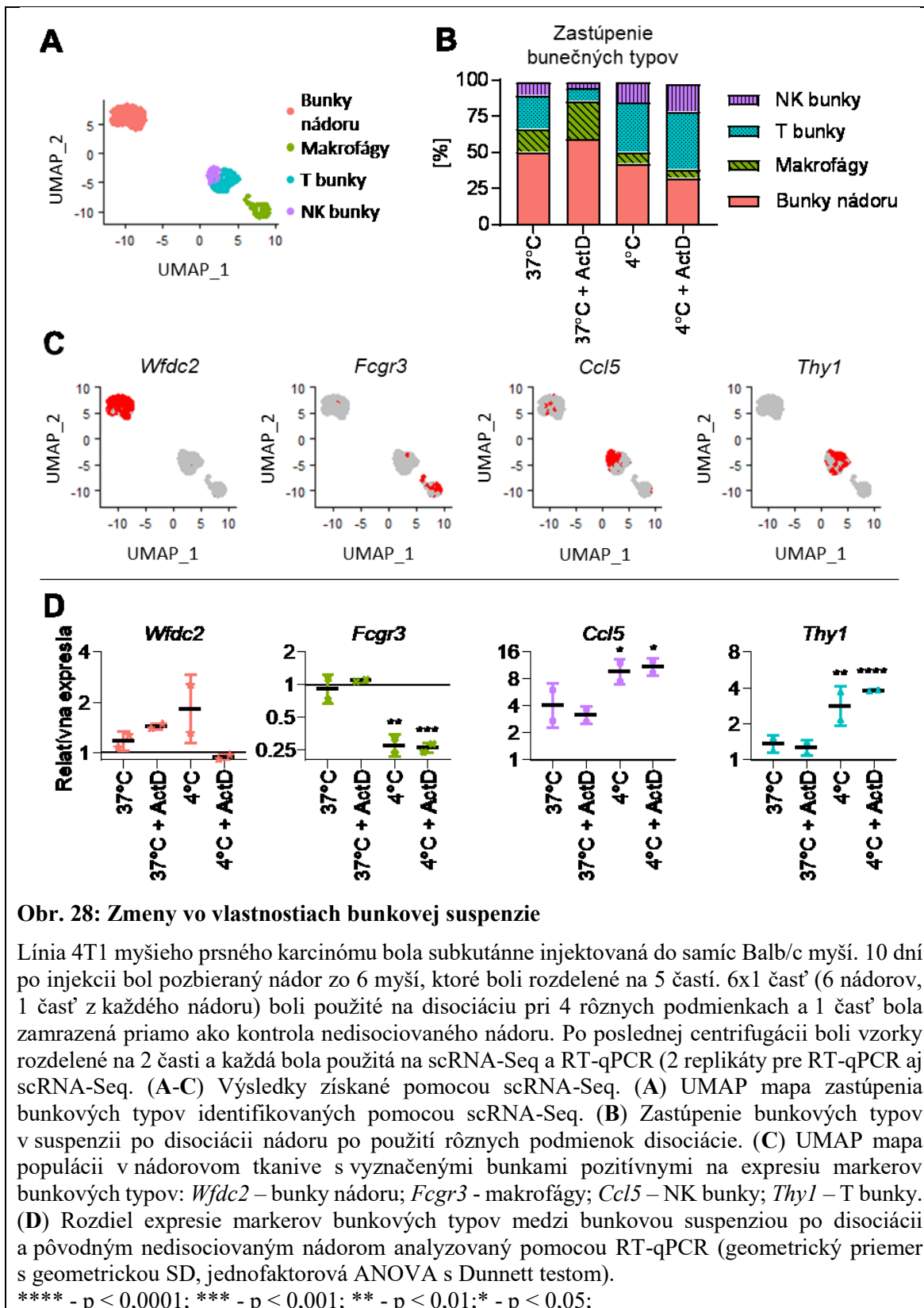
reagujúcich na stres sme vybrali jeden kandidátny gén: *Fos*. Vplyvom disociácie pri 37 °C došlo k zvýšeniu hladiny *Fos* takmer 16-násobne a pridanie ActD malo len minimálny efekt (**Obr. 27C**). Na druhej strane, v priebehu disociácie pri 4 °C došlo len k minimálnym zmenám v expresii *Fos*.

Výsledky z RT-qPCR sme porovnali s výsledkami z scRNA-Seq. Celkovo sme analyzovali 654 buniek, ktoré sme rozdelili do 4 hlavných skupín: bunky nádoru, makrofágy, T bunky a NK bunky (**Obr. 27D**). Expresia *Fos* bola pozorovaná predovšetkým v bunkách nádoru (**Obr. 27E**), pričom viac ako 25 % všetkých buniek bolo pozitívnych na expresiu *Fos* po disociácii pri 37 °C (**Obr. 27F**). Po disociácii pri 4 °C neboli pozorované takmer žiadne *Fos*+ bunky. Efekt ActD bol v oboch prípadoch minimálny.

Zmeny vo vlastnostiach bunkovej suspenzie po znížení teploty disociácie

Pre popis celkového efektu disociácie na zmeny vlastností bunkovej suspenzie sme sa zamerali nie len na sledovanie zmien expresie génov reagujúcich na stres, ale aj na zmeny v zastúpení bunkových populácií. Disociácia pri 37 °C viedla k zvýšenému zastúpeniu buniek nádoru a makrofágov v porovnaní s disociáciou pri 4 °C, kedy bolo zvýšené zastúpenie T buniek a NK buniek (**Obr. 28B**). Pre určenie, ktorý z týchto pomerov je bližšie k vlastnostiam pôvodného nedisociovaného nádoru sme porovnali expresiu vybraných markerov v bunkovej suspenzii (**Obr. 28C**) a nedisociovaného nádoru pomocou RT-qPCR. Nepozorovali sme žiadne signifikantné zmeny v zastúpení buniek nádoru (**Obr. 28D**). Disociácia pri 37 °C viedla k menším zmenám v expresii ďalších sledovaných markerov v porovnaní s disociáciou pri 4 °C. Opäť, efekt ActD bol minimálny.





Obr. 28: Zmeny vo vlastnostiach bunkovej suspenzie

Línia 4T1 myšieho prsného karcinómu bola subkutánne injektovaná do samíc Balb/c myši. 10 dní po injekcii bol pozbieraný nádor zo 6 myši, ktoré boli rozdelené na 5 častí. 6x1 časť (6 nádorov, 1 časť z každého nádoru) boli použité na disociáciu pri 4 rôznych podmienkach a 1 časť bola zamrznutá priamo ako kontrola nedisociovaného nádoru. Po poslednej centrifugácii boli vzorky rozdelené na 2 časti a každá bola použitá na scRNA-Seq a RT-qPCR (2 replikáty pre RT-qPCR aj scRNA-Seq. (A-C) Výsledky získané pomocou scRNA-Seq. (A) UMAP mapa zastúpenia bunčných typov identifikovaných pomocou scRNA-Seq. (B) Zastúpenie bunčných typov v suspenzii po disociácii nádoru po použití rôznych podmienok disociácie. (C) UMAP mapa populácie v nádorovom tkanive s vyznačenými bunkami pozitívnymi na expresiu markerov bunčných typov: *Wfdc2* – bunky nádoru; *Fcgr3* - makrofágy; *Ccl5* – NK bunky; *Thy1* – T bunky. (D) Rozdiel expresie markerov bunčných typov medzi bunkovou suspenziou po disociácii a pôvodným nedisociovaným nádorom analyzovaný pomocou RT-qPCR (geometrický priemer s geometrickou SD, jednofaktorová ANOVA s Dunnett testom).

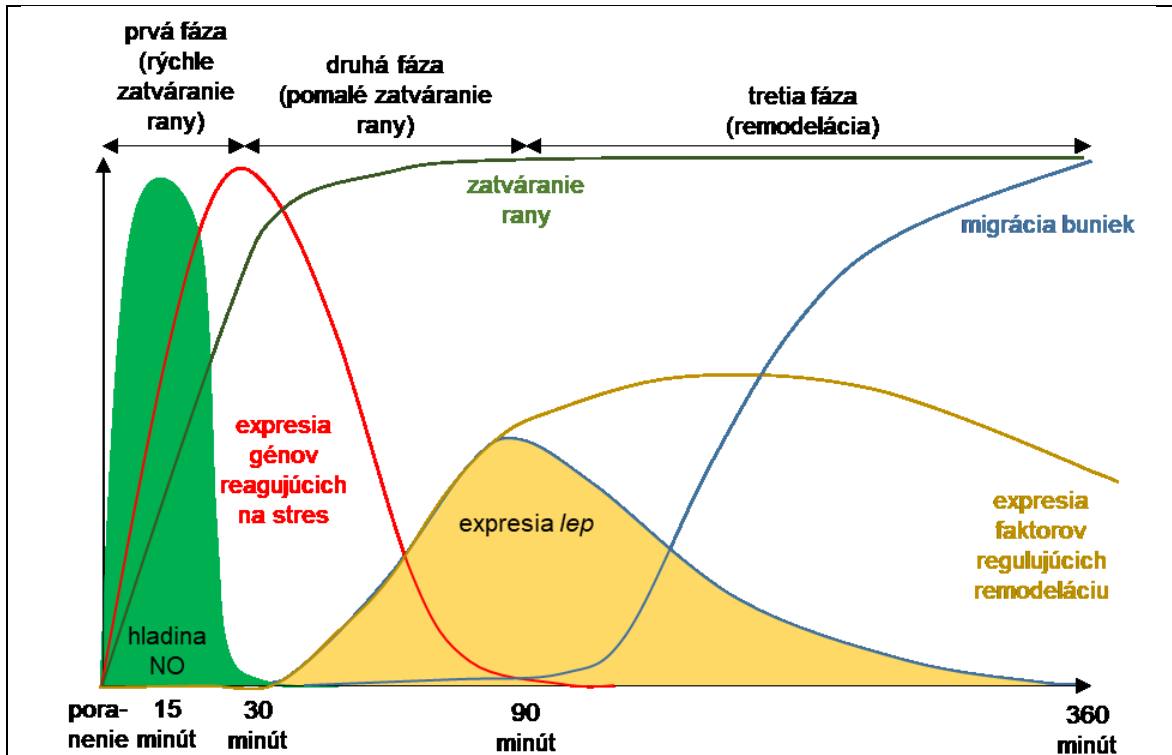
**** - $p < 0,0001$; *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$;

5. Diskusia

Porozumenie molekulárnym mechanizmom regulujúcim úspešnú regeneráciu a hojenie po poranení je rozhodujúce pre pokrok v rýchlo vyvíjajúcej sa regeneratívnej medicíne. Jedným z fenoménov hojenia, ktorý fascinuje vedcov už dlhé roky je hojenie u embryí, ktoré na rozdiel od hojenia dospelých jedincov prebieha bez vzniku jazvy (Larson, et al., 2010). Navyše, tento proces je u embryí aj rýchlejší. Presný mechanizmus regulácie embryonálneho hojenia nie je stále známy, napriek mnohým štúdiám zameraným na jeho popis (Li, et al., 2016). Jedným z populárnych modelov na štúdium hojenia sú embryá pazúrnatky vodnej. Výhodou ich použitia je ich veľkosť, mimotelový vývoj a veľký počet. Štúdie zamerané na popis mechanizmu hojenia embryí pazúrnatky využívajú predovšetkým najrannejšie vývojové štádia – vajíčko, alebo gastrulu (Li, et al., 2013; Davenport, et al., 2016; Li, et al., 2016; Soto, et al., 2013). My sme sa zamerali na analýzu staršieho vývojového štádia – štádia 26. Výhodou použitia tohto štádia je zložitejšia štruktúra, kedy už obsahuje mnoho typov diferencovaných buniek (napr. epidermis/pokožka je zložená z 5 odlišných bunkových typov), avšak ešte stále nie je úplne vyvinutý cievny a imunitný systém. Práve prítomnosť a aktivita imunitného systému je najčastejšie spomínaná ako jeden z hlavných regulátorov vzniku jazvy po poranení (Duffield, et al., 2005; Lucas, et al., 2010). Jedným zo znakov zápalu počas hojenia je produkcia malých reaktívnych molekúl, ktoré majú antimikrobiálne vlastnosti (Vatansever, et al., 2013). Najčastejšie študovanými molekulami sú ROS, avšak hojenie môže byť regulované aj inými molekulami plynov (ktoré sú tiež nazývané plynné transmitery, alebo gasotransmitery) ako oxid uhoľnatý (CO) (Ahanger, et al., 2011; Takagi, et al., 2016), sulfán (H₂S) (Liu, et al., 2014; Zhao, et al., 2017) a oxid dusnatý (NO) (Witte & Barbul, 2002). Prekvapivo, v poslednej dobe je venované len veľmi málo priestoru analýze úlohy NO v priebehu hojenia. NO je najčastejšie spájaný s reguláciou modulácie ECM (Xing, et al., 2015), angiogenézy (Sessa, 2009) a zápalu (Korhonen, et al., 2005; Bosca, et al., 2005; Coleman, 2001). Avšak, k masívnemu nárastu produkcie NO v dôsledku poranenia dochádza už v ranných vývojových štádiách, akými sú gastrula a neurula (**Obr. 5**), kedy ešte nie je prítomný a vyvinutý ani cievny ani imunitný systém. Preto sme sa zamerali na úlohu NO v priebehu embryonálneho hojenia.

Embryonálne hojenie sa zvyčajne delí na dve fázy. V priebehu prvej fázy, ktorá je veľmi rýchla a trvá asi 30 minút, dochádza k uzavretiu takmer celého poranenia. Nasledujúca druhá fáza, ktorá je pomalšia a prebieha medzi 30 až 90 minútou po poranení, končí úplným uzavretím poranenia (Li, et al., 2013). V našej štúdií sme pozorovali ešte

d'alšiu, tretiu fázu embryonálneho hojenia, ktorá, pokiaľ je nám známe, okrem nás ešte nebola v literatúre spomenutá a popísaná. Počas tejto fázy prebieha remodelácia poškodeného tkaniva pod miestom poranenia a môže trvať niekoľko hodín po uzavretí poranenia (Obr. 29).



Obr. 29: Priebeh embryonálneho hojenia – procesy, ktoré sú ovplyvnené NO.

Hladina NO začína rásť ihneď po poranení a dosahuje maximum 15 minút po poranení. Pôvodná fyziologická hladina sa obnovuje 30 minút po poranení, kedy končí prvá fáza (fáza rýchleho zatvárania rany). Na konci tejto fázy je uzavretá rana na približne 80 %. *De novo* expresia génov reagujúcich na stres začína tiež krátko po poranení, pričom maximálna hladina expresie týchto génov je na konci prvej fázy a obnovuje sa na fyziologickú hladinu 90 minút po poranení. Súčasne, na začiatku druhej fázy začína expresia faktorov regulujúcich remodeláciu a *lep*. Maximálna hladina ich expresie je 90 minút po poranení, kedy rana je už úplne uzatvorená a začína fáza remodelácie. Vo fáze remodelácie začína migrácia buniek do miesta poranenia.

Prvá fáza embryonálneho hojenia (fáza rýchleho zatvárania rany, 0–30 minút po poranení)

Prvá fáza embryonálneho hojenia začína ihneď po poranení a končí približne 30 minút po poranení kedy je uzavretých približne 80 % veľkosti pôvodnej rany (Yoshii, et al., 2005; Li, et al., 2013). My sme v priebehu tejto fázy pozorovali extrémne zvýšenie hladiny NO vplyvom poškodenia tkaniva (Obr. 7). Vysoká hladina NO bola pozorovaná vo všetkých epidermálnych bunkách na okraji poranenia a nebola špecifická len pre jeden bunkový typ. Táto vysoká hladina NO môže slúžiť ako nešpecifická zápalová reakcia, kedy NO má antimikrobiálnu funkciu, alebo môže slúžiť k regulácii chemotaxie (Bogdan, 2001).

Maximálna hladina NO bola pozorovaná 15 minút po poranení a následne začala klesať. Pokles na pôvodnú fyziologickú hladinu nastáva približne 30-60 minút po poranení, na konci prvej fázy embryonálneho hojenia.

Proces hojenia je iniciovaný uvoľnením iónov Ca^{2+} do vnútrobunkového priestoru (Li, et al., 2016). To nastáva v priebehu sekúnd a v priebehu pár nasledujúcich minút je hladina iónov Ca^{2+} obnovená na pôvodnú hladinu (Minns, et al., 2016; Leiper, et al., 2006). V čase, keď sa obnovuje hladina NO, tak začína produkcia ROS (Ferreira, et al., 2018; Love, et al., 2013). Časová sekvencia uvoľnenia iónov Ca^{2+} , produkcie NO a ROS naznačuje prepojenie týchto malých molekúl medzi sebou. Avšak pre potvrdenie tejto hypotézy sú potrebné ďalšie analýzy. Zaujímavosťou je, že rovnaký princíp uvoľnenia iónov Ca^{2+} nasledovaný produkciou ROS bol pozorovaný aj po oplodnení vajíčok pazúrnatky (Han, et al., 2018). My sme síce nepozorovali produkciu NO v tomto štádiu vývoja, avšak veríme, že dôvod je predovšetkým technický, kedy nami používaná metóda má limitácie v rozlíšení a detekcii menších zmien v hladine NO.

V priebehu hojenia sme pozorovali 269 génov, ktorých expresia je zmenená počas prvých 90 minút po poranení a zablokovanie produkcie NO vedie k ďalšej zmene ich expresie (**Obr. 11**). Z nich, 31 génov má maximálnu expresiu 30 minút po poranení, ktorá následne klesá. Zablokovanie produkcie NO viedlo ku kontinuálne zvýšenej expresii týchto génov (**Obr. 11F**) a to nie len počas hojenia, ale aj v priebehu embryonálneho vývoja (**Obr. 22**). Zaujímavosťou je, že expresiu týchto génov môžeme sledovať ako univerzálnu odpoveď na ľubovoľný stres. My sme pozorovali expresiu *fos* už po poranení gastruly (**Obr. 25**) ale aj po amputácii chvostíka starších embryí (**Obr. 24B**). Dokonca, expresia podobných génov bola pozorovaná v dospelom tkanive u myši a dania pruhovaného 60 minút po smrti (Pozhitkov, et al., 2017).

Pretože táto odpoveď na stres je veľmi rýchla, okamžitá a univerzálna, tak môže mať aj negatívny efekt na analýzy génovej expresie. Napríklad, cieľom práce Ding et al. (2017) bolo študovanie génovej expresie špecifickej pre dorzálnu a ventrálnu oblasť embrya v štádiu gastruly. Avšak, odber tkaniva z daných oblastí trval dlhú dobu a preto pozorovali zmeny v expresii génov ako sú *jun*, *fos*, *egr1* alebo *junb*. Ďalší typ analýzy, kde bola pozorovaná umelo zvýšená expresia týchto génov je scRNA-Seq (van den Brink, et al., 2017; Wu, et al., 2017; Adam, et al., 2017). Prvým krokom scRNA-Seq je disociácia tkaniva na suspenziu obsahujúcu jednotlivé bunky. Problémom je, že disociácia vedie tiež k aktivácii stresovej odpovedi a zvýšeniu expresie týchto génov (**Obr. 27**), čo vo finále môže viesť k nesprávnym záverom (van den Brink, et al., 2017). Jedno z navrhnutých riešení je práca

pri nižšej teplote (**Obr. 27**) (Adam, et al., 2017), kedy dôjde k spomaleniu až k zastaveniu biologických procesov. Nevýhodou, v prípade enzymatickej disociácie tkaniva, je to, že dôjde aj k zníženiu aktivity enzýmu, čo môže viesť k iným nesprávnym záverom (**Obr. 28**).

Na základe dostupnej literatúry a našich výsledkov sme dospeli k záveru, že tieto gény sú dôležité pre bunky na vyrovnanie sa so stresovými podmienkami a tak na ne odkazujeme ako na gény reagujúce na stres. Avšak, expresia génov reagujúcich na stres nebola pozorovaná len v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie, niektoré z týchto génov patria aj medzi tzv. onkogény. Podobnosť medzi hojením a rastom nádoru viedla už v 70. rokoch 20. storočia k pomenovaniu nádoru ako „super hojaca sa rana“ (Haddow, 1972) a v 80. rokoch bol nádor popísaný ako „rana, ktorá sa nehojí“ (Dvorak, 1986). Jedným z rozdielov medzi hojením a vznikom a rastom nádoru je deregulácia procesu hojenia, ktorý následne vedie k vzniku nádoru (Ellisen, 2017). My sme pozorovali, že expresia génov zo skupiny génov reagujúcich na stres je aktivovaná len krátku dobu po poranení a následne je obnovená na fyziologickú hladinu, zatiaľ čo v priebehu rastu nádoru je neustále zvýšená (**Obr. 24**). Navyše sme pozorovali, že k deregulácii expresie týchto génov dochádza po zablokovaní produkcie NO, kedy podobne ako v nádore je expresia týchto génov po dosiahnutí maximálnej hladiny naďalej zvýšená. Vzťah medzi produkciou NO a nádorom bol niekoľko krát študovaný, kedy bol ukázaný efekt NO na rast nádoru, ako pozitívny tak aj negatívny (Szabo, 2016; Salimian Rizi, et al., 2017). Naše výsledky dávajú príležitosť pre ďalšie štúdium vzťahu medzi hojením, vznikom nádoru a produkciou NO.

Druhá fáza embryonálneho hojenia (fáza pomalého zatvárania rany, 30–90 minút po poranení)

Na konci prvej fázy embryonálneho hojenia ostáva rana s plochou približne 20 % oproti veľkosti pôvodnej rany. Druhá fáza končí úplným uzatvorením rany približne 90 minút po poranení. V druhej fáze hojenia sa hladina NO vracia na pôvodné hodnoty. Zablokovanie produkcie NO viedlo len k spomaleniu rýchlosti zatvárania rany v priebehu prvej fázy hojenia (**Obr. 9B**). Až v priebehu druhej fázy hojenia došlo k takmer úplnému zastaveniu zatvárania rany (**Obr. 9D**). Preto sme chceli overiť signálnu dráhu, ktorou je regulovaný proces embryonálneho hojenia. V rôznych prácach bolo ukázané, že NO reguluje génovú expresiu cez cGMP-závislú signálnu dráhu v mnohých biologických procesoch, ktoré sú dôležité aj pre hojenie, ako je apoptóza (Ciani, et al., 2002), proliferácia (Mujoo, et al., 2010) a angiogenéza (Zhang, et al., 2003). Pozorovali sme, že v prvej fáze

embryonálneho hojenia funguje NO pravdepodobne cez cGMP-nezávislú dráhu, zatiaľ čo cGMP-závislá dráha je dôležitá až v druhej fáze (**Obr. 14, Obr. 15**).

Jedným z najlepšie popísaných procesov v priebehu embryonálneho hojenia je formovanie sa aktíno-myozínového prstenca na okraji rany (Li, et al., 2016), ktorý slúži na jej kontrakciu. Pozorovali sme, že tak ako v kontrolách, tak aj v embryách so zablokovanou produkciou NO došlo k formovaniu aktínového prstenca v prvej fáze hojenia. Avšak, v prípade zablokovania NO produkcie krátko pred poranením vznikol aktínový prstenec s prerušeniami. Výrazný rozdiel sme pozorovali až v priebehu druhej fázy, kedy dochádzalo k postupnej kontrakcii rany u kontrol a znižovaniu signálu pre aktín, zatiaľ čo zablokovanie NO produkcie viedlo k pretrvávajúcej nadprodukcii aktínových vlákien. Navyše, v prípade chronického zablokovania produkcie NO spôsobeného injekciou *nos1+nos3*-MO do oplodneného vajíčka, sme pozorovali nadprodukcii aktínu. Dereguláciu formovania aktínových štruktúr vplyvom *nos1*-MO sme pozorovali aj v priebehu vývoja embryonálnej epidermis (Tomankova, et al., 2017; Tomankova, 2018). Kombinácia týchto výsledkov spolu s výsledkami z expresie génov reagujúcich na stres po zablokovaní produkcie NO nás vedie k hypotéze, že NO v prvej fáze hojenia aktivuje procesy, ktoré v druhej fáze hojenia fungujú okrem iného ako spätné vypínače procesov bunkového stresu.

Pomocou RNA-Seq analýzy sme identifikovali skupinu génov, ktorých expresia rastie v priebehu embryonálneho hojenia avšak ich expresia nie je aktivovaná, alebo je oneskorená po zablokovaní produkcie NO (**Obr. 11B**). Navyše, do tejto skupiny patria gény, ktorých expresia začína rásť až na začiatku druhej fázy. Medzi ne patria napr. *lep*, *igfbp2* a *mmp8*. Gény z tejto skupiny sú spájané s reguláciou imunitnej odpovede a metabolizmom. Dôležitosť génov *lep* a *igfbp2* pre priebeh správneho hojenia a regenerácie už bola ukázaná (Tadokoro, et al., 2015; Zheng, et al., 2017; Yamaguchi, et al., 2013) a navyše sú spájané s bunkovým metabolizmom (Harris, 2014; Blanquer-Rossello, et al., 2016; Wang, et al., 2016). Leptín je malý peptidový hormón, ktorý sa občas nazýva aj „hormón sýtosti“. Tento hormón účinkuje cez aktiváciu transmembránového receptora Lep-R (tiež známy ako Ob-R) a reguluje homeostázu energie (Zhang, et al., 1994). Vzťah Lep a NO bol študovaný, avšak neexistuje jednoznačné určenie ich vzájomnej interakcie. Jedny štúdie pozorovali aktiváciu produkcie NO pomocou Lep cez PKA a MAPK signalizáciu (Mehebig, et al., 2005), zatiaľ čo iné štúdie ukazujú opačný efekt, kedy Lep viedol k zníženiu produkcie NO (Canabal, et al., 2007; Blanquicett, et al., 2007). My sme pozorovali interakciu v opačnom poradí, kedy zablokovanie produkcie NO viedlo k potlačeniu expresie *lep* (**Obr. 12A, C, Obr. 13A**). V experimentoch s embryami s injektovaným *lep*-MO sme pozorovali podobné

výsledky ako u experimentov so zablokovanou produkciou NO. Zaujímavosťou je, že napriek tomu, že hladina expresie *lep* v priebehu vývoja embryí pazúrnatky vodnej je pod limitom detekcie metód použitých pre analýzu génovej expresie, tak efekt *lep*-MO na vývoj bol extrémne závislý na použitom množstve MO. Injekcia pár nanogramov pod alebo nad optimálne množstvo viedlo k tomu, že buď nebol pozorovaný žiaden fenotyp a efekt, alebo došlo k zablokovaniu vývoja v štádiu neuruly, ktoré následne viedlo k rozpadu a smrti. Na potvrdenie vzťahu medzi NO a Lep sme testovali kombináciu NO inhibítorov, alebo *lep*-MO s NO donormi alebo Lep proteínom/mRNA, avšak ani jeden z týchto experimentov nevedol k signifikantnej zmene rýchlosti hojenia (nezobrazené výsledky). Predpokladáme, že dosiahnutie efektu je ukryté v presne definovanej koncentrácii jednotlivých molekúl potrebných pre proces hojenia. Navyše, proces hojenia je regulovaný presne určenou časovou a priestorovou lokalizáciou jednotlivých molekúl a nadprodukcia alebo lokalizácia v celom embryu môže tiež viesť ku nežiadúcim zmenám v procese hojenia. Napr. injekcia Lep proteínu alebo mRNA do oplodneného vajíčka viedla k vysokej hladine *lep* v celom embryu a v priebehu hojenia už nedochádzalo k zmene jeho expresie (nezobrazené výsledky). Expresia *lep* bola pozorovaná aj v priebehu regenerácie chvostíka a srdca dania pruhovaného (Kang, et al., 2016). Autori tejto štúdie identifikovali enhancerovú oblasť *lepb*, ktorá je aktivovaná po poranení. Jedna z možností vzájomného vzťahu NO a *lep* je aktivácia enhancerových proteínov cez NO signálnu dráhu. Na potvrdenie tejto hypotézy budú potrebné ďalšie experimenty.

Dôležitou vlastnosťou hojenia dospelých jedincov je migrácia buniek imunitného systému a ich aktivita v mieste rany. Produkcia NO je vyžadovaná pre správne fungovanie imunitného systému v priebehu prvých fáz hojenia dospelých jedincov (Witte & Barbul, 2002). My sme predpokladali iný spôsob pôsobenia NO v priebehu embryonálneho hojenia, pretože embryá nemajú úplne vyvinutý imunitný systém, ktorý zahŕňa úplne diferencované B a T bunky, ktoré sú vyvinuté u pazúrnatky vodnej až 12 dní po oplodnení (štádium 47) (Robert & Ohta, 2009). Na druhej strane, v štádiu 26 existujú primitívne myeloidné bunky (Costa, et al., 2008), ktoré môžu mať efekt na obranu organizmu. Avšak, my sme nepozorovali zmeny v expresii markerových génov týchto buniek, ako sú *mmp7*, *mmp9*, *spib* alebo *mpo* (Agricola, et al., 2016; Briggs, et al., 2018; Harrison, et al., 2004; Tomlinson, et al., 2008) v priebehu prvých dvoch fáz embryonálneho hojenia. Prekvapivo sa ich expresia začala meniť až viac ako 3 hodiny po poranení, kedy rana už bola úplne uzatvorená (**Obr. 18B**). To nás viedlo k záveru, že existuje ďalšia (tretia) fáza embryonálneho hojenia, fáza remodelácie.

Tretia fáza embryonálneho hojenia (fáza remodelácie, viac ako 90 minút po poranení)

Tretia fáza embryonálneho hojenia (fáza remodelácie) zatiaľ nikde nebola definovaná. Táto fáza začína po uzatvorení rany. V tejto fáze je tkanivo, v oblasti kde došlo k poraneniu, remodelované a bunky ako primitívne myeloidné bunky migrujú do miesta poranenia.

Analýza štruktúry poranenia po značení laminínu ukázala, že u kontrol dochádza v priebehu remodelácie v mieste poranenia k narušeniu laminínovej vrstvy, ktorá sa následne 6 hodín po poranení obnovuje. Zablockovanie produkcie NO viedlo k dvom odlišným pozorovaniam. Chronické (dlho trvajúce) zablockovanie produkcie NO viedlo k poškodeniu bazálnej membrány už v priebehu vývoja. Napriek tomu, začiatok hojenia vyzerá podobne. V neskorej fáze boli pretrvávajúce defekty v bazálnej membráne, čo podľa nás vedie k spomaleniu zatvárania hojenia. Predpokladáme, že v embryách so zablockovanou produkciou NO, bunky na okraji rany nemôžu migrovať po poškodenej bazálnej membráne, čo je dôležité pre uzavretie rany. Na druhej strane, akútne (okamžité) zablockovanie produkcie NO viedlo k inému efektu, kedy bazálna membrána na okraji rany ostávala nezmenená a na tomto mieste došlo k akumulovaniu buniek, ktoré vytvárali bližšie nešpecifikovaný zhhluk buniek (**Obr. 16A, B, C**). To nás vedie k predpokladu, že zmeny v štruktúre bazálnej membrány sú dôležité pre umožnenie migrácie buniek do rany a jej uzavretie. Štúdium prepojenia remodelácie bazálnej membrány a efektivity hojenia je predmetom ďalších experimentov.

Na remodelácii tkaniva sa podieľa mnoho enzýmov, jedným z nich sú aj MMP. MMP môžu mať ako pozitívny tak aj negatívny efekt na priebeh hojenia (Caley, et al., 2015). My sme sledovali expresiu pre niektoré *mmp*, ktoré sú spájané s remodeláciou tkaniva – kolagenázy *mmp1* a *mmp8*. Ich expresia v kontrolných embryách bola zvýšená v priebehu prvej a druhej fázy hojenia a klesala v priebehu fázy remodelácie. Zablockovanie produkcie NO viedlo k zníženiu ich expresie v prvých dvoch fázach hojenia, ale naopak k veľkému zvýšeniu expresie v priebehu tretej fázy (**Obr. 18B**). Bolo ukázané, že expresia *mmp1* je regulovaná expresiou laminínu (Sudbeck, et al., 1997). Preto, zmenená produkcia laminínu v NO inhibovaných embryách môže mať efekt na zvýšenú aktivitu MMP1 v rane a k zhoršenej schopnosti hojenia. Efekt *mmp8* na hojenie môže byť dvojaký. Znížená expresia *mmp8* (u myši) viedla k zvýšeniu TGF- β aktivity, spomaleniu uzatvárania rany a zníženiu infiltrácie neutrofilov do miesta poranenia (Gutierrez-Fernandez, et al., 2007). To je v zhode s výsledkami expresie *mmp8* v prvej a druhej fáze hojenia po zablockovaní

produkcie NO. Naopak, zvýšená expresia *mmp8* býva spájaná so vznikom chronických/nehojajících sa rán (Danielsen, et al., 2011). My sme pozorovali efekt zvýšenia expresie *mmp8* v tretej fáze hojenia po zablokovaní produkcie NO (**Obr. 18B**). Problémy v produkcii NO sa niekedy spájajú aj so vznikom chronických rán (Witte & Barbul, 2002), čo môže súvisieť aj so zvýšenou aktivitou MMP8.

Iné dve MMP – *mmp7* a *mmp9* sú používané aj ako markery primitívnych myeloidných buniek (Agricola, et al., 2016; Briggs, et al., 2018; Harrison, et al., 2004; Tomlinson, et al., 2008). Zablokovanie produkcie NO viedlo k spomaleniu/zastaveniu migrácie týchto buniek do miesta poranenia (**Obr. 18**) a to nie len v priebehu hojenia, ale aj v priebehu regenerácie (**Obr. 19**). Na základe týchto výsledkov sme dospeli k záveru, že produkcia NO na začiatku po poranení je dôležitá pre aktiváciu signálnych kaskád aktívnych v neskorších fázach, ktoré sú nevyhnutné pre správny priebeh hojenia a regenerácie, ako je migrácia buniek do miesta poranenia. Tiež sme sledovali, že zablokovanie produkcie NO už v priebehu prvých dvoch hodín od amputácie vedie k zablokovaniu schopnosti embryí pazúrnatky vodnej regenerovať chvostík po amputácii, čo môže byť spôsobené zablokovaním aktivácie procesov nutných pre naštartovanie regenerácie. Napríklad Aztekin et al. (2019) identifikovali bunky, ktoré nazvali regeneráciu organizujúce bunky („regeneration-organizing cells“), ktoré migrujú do miesta amputácie a vytvárajú tzv. epidermis rany („wound epidermis“). Zablokovanie ich migrácie vedie k zastaveniu schopnosti regenerovať. Autori tejto práce neidentifikovali presnú dráhu, ktorá reguluje migráciu týchto buniek do miesta amputácie. My sa domnievame, že jeden z regulátorov migrácie môže byť práve NO.

Vplyv NO na proces hojenia

V tejto práci sme popísali vplyv NO na proces embryonálneho hojenia a regenerácie. Ukázali sme, že produkcia NO na začiatku po poranení je dôležitá pre správny priebeh hojenia a regenerácie v ďalších fázach. Avšak, z literatúry je známe, že NO nie je dôležitý len pre správny priebeh hojenia, ale zvýšenie jeho hladiny (napr. použitím NO donorov) môže tiež významne zlepšiť priebeh hojenia, hlavne hojenia chronických (nehojajících) sa rán.

Napríklad, donory NO boli použité na zlepšenie hojenia diabetických myší (Witte, et al., 2002) a diabetických imunodeficitných myší (NOD-SCID) (Blecher, et al., 2012). Navyše donory NO boli použité na zrýchlenie migrácie buniek pri sledovaní procesov hojenia *in vitro* (Spitler, et al., 2013; Han, et al., 2012). Ďalej, aplikácia krému obsahujúceho

sildenafil (inhibitor cGMP špecifickej fosfodiesterázy – PDE5) pomohla zrýchliť hojenie po poranení kože u ľudí (Gursoy, et al., 2014). V našich experimentoch sme neboli schopný zrýchliť hojenie použitím NO donoru SNAP. Domnievame sa, že vysvetlenie je podobné, ako dôvod nefunkčnosti rescue experimentov – produkcia NO je presne lokalizovaná ako v čase, tak aj v priestore a neboli sme schopný zabezpečiť na malej ploche embryonálnej rany dostupnosť NO donoru na správnom mieste a v správnom čase. Navyše, pretože embryonálne hojenie je veľmi rýchly proces, bolo by veľmi náročné presne zmerať a určiť akékoľvek zrýchlenie a zlepšenie zatvárania rany. Napriek tomu veríme, že naše výsledky budú mať uplatnenie v štúdiu možnosti zlepšenia efektivity hojenia.

Asi najatraktívnejšie je využitie donorov NO v humánnej medicíne. Využitie donorov NO v rôznych postupoch liečby ľudí bol nedávno zhrnutý kolektívom autorov Yang, et al. (2018). Napr. NO donory boli použité pri liečbe preležanín a preukázali štatisticky významné zrýchlenie liečby (Saidkhani, et al., 2016). Podobne, NO donory sa ukazujú ako potenciálne ideálna liečba pre pacientov s tzv. vredmi diabetickej nohy (Edmonds, et al., 2018). Avšak, súčasne poznatky o mechanizme aktivity NO sú limitované predovšetkým na popis regulácie angiogenézy a zápalu. V našej práci sme predstavili nové prepojenie medzi NO a Lep, kedy NO reguluje Lep. Znalosť tejto regulácie je dôležitá pre porozumenie molekulárnych mechanizmov mnohých chronických ochorení ako je vysoký krvný tlak, cukrovka a obezita v spojení s problémami s hojením. Rovnako sme pozorovali nové prepojenie medzi NO a AP-1 a vzťah regulácie hojenia a vzniku rakoviny. Naše výsledky potvrdzujú dôležitosť ďalšieho štúdia mechanizmov aktivity NO v priebehu hojenia pre použitie cielenej/personalizovanej medicíny v budúcnosti.

6. Záver

Táto práca ukazuje kľúčovú úlohu NO v priebehu embryonálneho hojenia. Výsledky naznačujú nezastupiteľnú funkciu NO v prvej fáze embryonálneho hojenia pri aktivácii expresie génov dôležitých pre celkový proces hojenia.

V tejto práci boli stanovené hlavné ciele:

1. Popis produkcie NO v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie

- NO je produkovaný po poranení vo všetkých ranných vývojových štádiách, začínajúc už od blastuly až po žubrienku v prvých dvoch vrstvách buniek od okraja rany.
- NO je produkovaný vo vysokých koncentráciách v priebehu prvých 30 minút embryonálneho hojenia a regenerácie.

2. Popis génovej expresie v priebehu hojenia a regenerácie u embryí so zablokovanou produkciou NO

- NO ovplyvňuje expresiu kľúčovej skupiny génov v priebehu embryonálneho hojenia.
- Zablokovanie produkcie NO v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie vedie k dlhšiemu zvýšeniu expresie génov reagujúcich na stres. To vedie k predĺženiu prvotných signálov po poranení a spomaleniu zatvárania rany.
 - o Medzi tieto gény patria napríklad *fos*, *jun*, *parp3*.
- Zablokovanie produkcie NO v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie vedie k zníženiu expresie génov regulujúcich metabolizmus. To prináša nový pohľad na úlohu NO v nehojacich sa ranách pri ochoreniach spojených s poruchami metabolizmu.
 - o Medzi tieto gény patria napríklad *lep* a *igfbp2*.
- Zablokovanie produkcie NO v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie vedie ku zmene expresie génov matrix metaloproteináz. Výsledkom toho je problematická remodelácia rany.
 - o Medzi tieto gény patria napríklad *mmp8* a *mmp9*.

3. Popis procesov závislých na produkcii NO v priebehu embryonálneho hojenia a regenerácie

- NO reguluje vytváranie aktíno-myozínového prstenca na okraji rany v priebehu prvej a druhej fázy embryonálneho hojenia. Problematická štruktúra aktínu vedie ku spomaleniu hojenia.
- NO reguluje zmeny štruktúry ECM v druhej a tretej fáze embryonálneho hojenia. To pravdepodobne vedie k hromadeniu buniek na okraji rany a bráni reepitelizácii a následnému uzavretiu rany.
- NO stimuluje migráciu primitívnych myeloidných buniek do miesta rany v tretej fáze embryonálneho hojenia a v priebehu regenerácie. Tieto bunky pravdepodobne napomáhajú remodelácii rany.

V tejto práci boli stanovené vedľajšie ciele:

1. Sledovanie zmien génovej expresie v priebehu embryonálneho vývoja po zablokovaní produkcie NO

- Dlhodobé zablokovanie produkcie NO v priebehu vývoja embryí vedie k zvýšeniu expresie génov reagujúcich na stres. Toto zvýšenie je špecifické len pre niektoré bunky pokožky.
 - o Medzi tieto gény patria napríklad *fos*, *jun*.
- Zablokovanie produkcie NO v priebehu vývoja embryí vedie ku zníženiu expresie génov spojených s vývojom embryonálnej pokožky. V dôsledku toho nastáva porucha vo vývoji pokožky.
 - o Medzi tieto gény patri napríklad *keratíny*, *kolagény* a *matrix metaloproteinázy*.

2. Porovnanie podobností a rozdielov medzi embryonálnym hojením, regeneráciou a rastom nádoru

- Expresia génov reagujúcich na stres je len krátkodobo zvýšená po poranení, alebo amputácii, zatiaľ čo ostáva naďalej zvýšená v priebehu rastu nádoru. Podobný efekt je pozorovaný v priebehu hojenia a regenerácie po zablokovaní produkcie NO. To je novým prepojením medzi NO a rastom nádoru.

3. Optimalizácia procesu prípravy suspenzie buniek pre RNA sekvenovanie na úrovni jednej bunky

- Disociácia vedie k zvýšeniu expresie génov reagujúcich na stres. To vedie ku nesprávnej interpretácii výsledkov.
- Znížením teploty disociácie a pridaním inhibítora transkripcie môžeme zabrániť tomuto procesu. Avšak, zníženie teploty vedie ku špecifickej strate niektorých typov populácii buniek.

7. Literatúra

- Abraham, N. G., & Kappas, A. (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*, *60*(1), 79-127. doi:10.1124/pr.107.07104
- Adam, M., Potter, A. S., & Potter, S. S. (2017). Psychrophilic proteases dramatically reduce single-cell RNA-seq artifacts: a molecular atlas of kidney development. *Development*, *144*(19), 3625-3632. doi:10.1242/dev.151142
- Agricola, Z. N., Jagpal, A. K., Allbee, A. W., Prewitt, A. R., Shifley, E. T., Rankin, S. A., . . . Kenny, A. P. (2016). Identification of genes expressed in the migrating primitive myeloid lineage of *Xenopus laevis*. *Dev Dyn*, *245*(1), 47-55. doi:10.1002/dvdy.24314
- Ahanger, A. A., Prawez, S., Kumar, D., Prasad, R., Amarpal, Tandan, S. K., & Kumar, D. (2011). Wound healing activity of carbon monoxide liberated from CO-releasing molecule (CO-RM). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *384*(1), 93-102. doi:10.1007/s00210-011-0653-7
- Alaish, S. M., Yager, D., Diegelmann, R. F., & Cohen, I. K. (1994). Biology of fetal wound healing: hyaluronate receptor expression in fetal fibroblasts. *J Pediatr Surg*, *29*(8), 1040-3. doi:10.1016/0022-3468(94)90275-5
- Alba-Loureiro, T. C., Hirabara, S. M., Mendonca, J. R., Curi, R., & Pithon-Curi, T. C. (2006). Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. *J Endocrinol*, *188*(2), 295-303. doi:10.1677/joe.1.06438
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, *357*(Pt 3), 593-615.
- Anders, S., McCarthy, D. J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G. K., Huber, W., & Robinson, M. D. (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protoc*, *8*(9), 1765-86. doi:10.1038/nprot.2013.099
- Andre-Levigne, D., Modarressi, A., Pepper, M. S., & Pittet-Cuenod, B. (2017). Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair. *Int J Mol Sci*, *18*(10). doi:10.3390/ijms18102149
- Antonio, N., Bonnelykke-Behrndtz, M. L., Ward, L. C., Collin, J., Christensen, I. J., Steiniche, T., . . . Martin, P. (2015). The wound inflammatory response exacerbates growth of pre-neoplastic cells and progression to cancer. *EMBO J*, *34*(17), 2219-36. doi:10.15252/embj.201490147
- Antunes, M., Pereira, T., Cordeiro, J. V., Almeida, L., & Jacinto, A. (2013). Coordinated waves of actomyosin flow and apical cell constriction immediately after wounding. *J Cell Biol*, *202*(2), 365-79. doi:10.1083/jcb.201211039
- Arnold, K. M., Opdenaker, L. M., Flynn, D., & Sims-Mourtada, J. (2015). Wound healing and cancer stem cells: inflammation as a driver of treatment resistance in breast cancer. *Cancer Growth Metastasis*, *8*, 1-13. doi:10.4137/CGM.S11286
- Arwert, E. N., Hoste, E., & Watt, F. M. (2012). Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nat Rev Cancer*, *12*(3), 170-80. doi:10.1038/nrc3217
- Aztekin, C., Hiscock, T. W., Marioni, J. C., Gurdon, J. B., Simons, B. D., & Jullien, J. (2019). Identification of a regeneration-organizing cell in the *Xenopus* tail. *Science*, *364*(6441), 653-658. doi:10.1126/science.aav9996
- Bagdade, J. D., Root, R. K., & Root, R. K. (1974). Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes*, *23*(1), 9-15. doi:10.2337/diab.23.1.9
- Bahrami, S., & Drablos, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Adv Biol Regul*, *62*, 37-49. doi:10.1016/j.jbior.2016.05.001

- Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357(9255), 539-45. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0
- Baltzis, D., Eleftheriadou, I., & Veves, A. (2014). Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther*, 31(8), 817-36. doi:10.1007/s12325-014-0140-x
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, 16(5), 585-601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
- Bartesaghi, S., & Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol*, 14, 618-625. doi:10.1016/j.redox.2017.09.009
- Beck, C. W., Izpisua Belmonte, J. C., & Christen, B. (2009). Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Dev Dyn*, 238(6), 1226-48. doi:10.1002/dvdy.21890
- Becht, E., McInnes, L., Healy, J., Dutertre, C. A., Kwok, I. W., Ng, L. G., . . . Newell, E. W. (2018). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol*. doi:10.1038/nbt.4314
- Belacortu, Y., & Paricio, N. (2011). *Drosophila* as a model of wound healing and tissue regeneration in vertebrates. *Dev Dyn*, 240(11), 2379-404. doi:10.1002/dvdy.22753
- Benink, H. A., & Bement, W. M. (2005). Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J Cell Biol*, 168(3), 429-39. doi:10.1083/jcb.200411109
- Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*, 499 (Pt 2), 291-306. doi:10.1113/jphysiol.1997.sp021927
- Bertolotti, E., Malagoli, D., & Franchini, A. (2013). Skin wound healing in different aged *Xenopus laevis*. *J Morphol*, 274(8), 956-64. doi:10.1002/jmor.20155
- Biaggioni, I., King, L. S., Enayat, N., Robertson, D., & Newman, J. H. (1989). Adenosine produces pulmonary vasoconstriction in sheep. Evidence for thromboxane A₂/prostaglandin endoperoxide-receptor activation. *Circ Res*, 65(6), 1516-25. doi:10.1161/01.res.65.6.1516
- Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E., & Flier, J. S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*, 1(4), 619-25. doi:10.1016/s1097-2765(00)80062-3
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Hemostasis. In *Medical Biochemistry* (pp. 781-789). Academic Press. doi:doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00031-8
- Blanquer-Rossello, M. D., Oliver, J., Sastre-Serra, J., Valle, A., & Roca, P. (2016). Leptin regulates energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 72, 18-26. doi:10.1016/j.biocel.2016.01.002
- Blanquicett, C., Graves, A., Kleinhenz, D. J., & Hart, C. M. (2007). Attenuation of signaling and nitric oxide production following prolonged leptin exposure in human aortic endothelial cells. *J Invest Med*, 55(7), 368-77. doi:10.2310/6650.2007.00017
- Blecher, K., Martinez, L. R., Tuckman-Vernon, C., Nacharaju, P., Schairer, D., Chouake, J., . . . Friedman, A. J. (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. *Nanomedicine*, 8(8), 1364-71. doi:10.1016/j.nano.2012.02.014
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2(10), 907-16. doi:10.1038/ni1001-907
- Boissel, J. P., Ohly, D., Bros, M., Godtel-Armbrust, U., Forstermann, U., & Frank, S. (2004). The neuronal nitric oxide synthase is upregulated in mouse skin repair and in response to epidermal growth factor in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 123(1), 132-9. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22731.x

- Boitano, S., Dirksen, E. R., & Sanderson, M. J. (1992). Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science*, 258(5080), 292-5. doi:10.1126/science.1411526
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-20. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bosca, L., Zeini, M., Traves, P. G., & Hortelano, S. (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*, 208(2), 249-58. doi:10.1016/j.tox.2004.11.035
- Bove, P. F., Wesley, U. V., Greul, A. K., Hristova, M., Dostmann, W. R., & van der Vliet, A. (2007). Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 36(2), 138-46. doi:10.1165/rcmb.2006-0253SM
- Brancato, S. K., & Albina, J. E. (2011). Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol*, 178(1), 19-25. doi:10.1016/j.ajpath.2010.08.003
- Briggaman, R. A., Schechter, N. M., Fraki, J., & Lazarus, G. S. (1984). Degradation of the epidermal-dermal junction by proteolytic enzymes from human skin and human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, 160(4), 1027-42. doi:10.1084/jem.160.4.1027
- Briggs, J. A., Weinreb, C., Wagner, D. E., Megason, S., Peshkin, L., Kirschner, M. W., & Klein, A. M. (2018). The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution. *Science*, 360(6392). doi:10.1126/science.aar5780
- Brock, J., Midwinter, K., Lewis, J., & Martin, P. (1996). Healing of incisional wounds in the embryonic chick wing bud: characterization of the actin purse-string and demonstration of a requirement for Rho activation. *J Cell Biol*, 135(4), 1097-107. doi:10.1083/jcb.135.4.1097
- Burrow, J. W., Koch, J. A., Chuang, H. H., Zhong, W., Dean, D. D., & Sylvia, V. L. (2007). Nitric oxide donors selectively reduce the expression of matrix metalloproteinases-8 and -9 by human diabetic skin fibroblasts. *J Surg Res*, 140(1), 90-8. doi:10.1016/j.jss.2006.11.010
- Caley, M. P., Martins, V. L., & O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(4), 225-234. doi:10.1089/wound.2014.0581
- Canabal, D. D., Song, Z., Potian, J. G., Beuve, A., McArdle, J. J., & Routh, V. H. (2007). Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292(4), E1418-28. doi:10.1152/ajpregu.00216.2006
- Cano Sanchez, M., Lancel, S., Boulanger, E., & Nevier, R. (2018). Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel)*, 7(8). doi:10.3390/antiox7080098
- Carter, R., Jain, K., Sykes, V., & Lanning, D. (2009). Differential expression of procollagen genes between mid- and late-gestational fetal fibroblasts. *J Surg Res*, 156(1), 90-4. doi:10.1016/j.jss.2009.03.056
- Ciani, E., Guidi, S., Bartesaghi, R., & Contestabile, A. (2002). Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J Neurochem*, 82(5), 1282-9.
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1(8), 1397-406.

- Cordeiro, J. V., & Jacinto, A. (2013). The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(4), 249-62. doi:10.1038/nrm3541
- Costa, R. M., Soto, X., Chen, Y., Zorn, A. M., & Amaya, E. (2008). spib is required for primitive myeloid development in *Xenopus*. *Blood*, *112*(6), 2287-96. doi:10.1182/blood-2008-04-150268
- Cowin, A. J., Brosnan, M. P., Holmes, T. M., & Ferguson, M. W. (1998). Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev Dyn*, *212*(3), 385-93. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3<385::AID-AJA6>3.0.CO;2-D
- Cui, S., Reichner, J. S., Mateo, R. B., & Albina, J. E. (1994). Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res*, *54*(9), 2462-7.
- Dang, C. M., Beanes, S. R., Lee, H., Zhang, X., Soo, C., & Ting, K. (2003). Scarless fetal wounds are associated with an increased matrix metalloproteinase-to-tissue-derived inhibitor of metalloproteinase ratio. *Plast Reconstr Surg*, *111*(7), 2273-85. doi:10.1097/01.PRS.0000060102.57809.DA
- Danielsen, P. L., Holst, A. V., Maltesen, H. R., Bassi, M. R., Holst, P. J., Heinemeier, K. M., . . . Agren, M. S. (2011). Matrix metalloproteinase-8 overexpression prevents proper tissue repair. *Surgery*, *150*(5), 897-906. doi:10.1016/j.surg.2011.06.016
- Davenport, N. R., Sonnemann, K. J., Eliceiri, K. W., & Bement, W. M. (2016). Membrane dynamics during cellular wound repair. *Mol Biol Cell*, *27*(14), 2272-85. doi:10.1091/mbc.E16-04-0223
- Davidson, L. A., Ezin, A. M., & Keller, R. (2002). Embryonic wound healing by apical contraction and ingression in *Xenopus laevis*. *Cell Motil Cytoskeleton*, *53*(3), 163-76. doi:10.1002/cm.10070
- Dinapoli, M. R., Calderon, C. L., & Lopez, D. M. (1996). The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Exp Med*, *183*(4), 1323-9. doi:10.1084/jem.183.4.1323
- Ding, Y., Colozza, G., Zhang, K., Moriyama, Y., Ploper, D., Sosa, E. A., . . . De Robertis, E. M. (2017). Genome-wide analysis of dorsal and ventral transcriptomes of the *Xenopus laevis* gastrula. *Dev Biol*, *426*(2), 176-187. doi:10.1016/j.ydbio.2016.02.032
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., . . . Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
- Douglas, B., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw*, *67*(1), 1-48. doi:doi:10.18637/jss.v067.i01
- Dovi, J. V., Szpadarska, A. M., & DiPietro, L. A. (2004). Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost*, *92*(2), 275-80. doi:10.1160/TH03-11-0720
- Duffield, J. S., Forbes, S. J., Constandinou, C. M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., . . . Iredale, J. P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*, *115*(1), 56-65. doi:10.1172/JCI22675
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., . . . Georgopoulos, N. T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J*, *14*(1), 89-96. doi:10.1111/iwj.12557

- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315(26), 1650-9. doi:10.1056/NEJM198612253152606
- Dvorak, H. F. (2015). Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res*, 3(1), 1-11. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0209
- Eden, E., Lipson, D., Yogev, S., & Yakhini, Z. (2007). Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. *PLoS Comput Biol*, 3(3), e39. doi:10.1371/journal.pcbi.0030039
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., & Yakhini, Z. (2009). GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, 10, 48. doi:10.1186/1471-2105-10-48
- Edmonds, M. E., Bodansky, H. J., Boulton, A. J., Chadwick, P. J., Dang, C. N., D'Costa, R., . . . Carter, M. J. (2018). Multicenter, randomized controlled, observer-blinded study of a nitric oxide generating treatment in foot ulcers of patients with diabetes-ProNOx1 study. *Wound Repair Regen*, 26(2), 228-237. doi:10.1111/wrr.12630
- Ellisen, L. W. (2017). A wound-healing program is hijacked to promote cancer metastasis. *J Exp Med*, 214(10), 2813-2815. doi:10.1084/jem.20171556
- Ferguson, M. W., Duncan, J., Bond, J., Bush, J., Durani, P., So, K., . . . O'Kane, S. (2009). Prophylactic administration of avotermin for improvement of skin scarring: three double-blind, placebo-controlled, phase I/II studies. *Lancet*, 373(9671), 1264-74. doi:10.1016/S0140-6736(09)60322-6
- Ferreira, F., Raghunathan, V., Luxardi, G., Zhu, K., & Zhao, M. (2018). Early redox activities modulate *Xenopus* tail regeneration. *Nat Commun*, 9(1), 4296. doi:10.1038/s41467-018-06614-2
- Filippin, L. I., Moreira, A. J., Marroni, N. P., & Xavier, R. M. (2009). Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide*, 21(3-4), 157-63. doi:10.1016/j.niox.2009.08.002
- Fitzmaurice, S. D., Sivamani, R. K., & Isseroff, R. R. (2011). Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacol Physiol*, 24(3), 113-26. doi:10.1159/000322643
- Forstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33(7), 829-37, 837a-837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
- Frank, S., Kampfer, H., Wetzler, C., & Pfeilschifter, J. (2002). Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int*, 61(3), 882-8. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00237.x
- Frank, S., Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N., & Pfeilschifter, J. (1999). Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J*, 13(14), 2002-14.
- Frankish, A., Diekhans, M., Ferreira, A. M., Johnson, R., Jungreis, I., Loveland, J., . . . Flicek, P. (2019). GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D766-D773. doi:10.1093/nar/gky955
- Fukazawa, T., Naora, Y., Kunieda, T., & Kubo, T. (2009). Suppression of the immune response potentiates tadpole tail regeneration during the refractory period. *Development*, 136(14), 2323-7. doi:10.1242/dev.033985
- Gajendraredy, P. K., Engeland, C. G., Junges, R., Horan, M. P., Rojas, I. G., & Marucha, P. T. (2013). MMP-8 overexpression and persistence of neutrophils relate to stress-impaired healing and poor collagen architecture in mice. *Brain Behav Immun*, 28, 44-8. doi:10.1016/j.bbi.2012.10.016

- Gallo, O., Masini, E., Morbidelli, L., Franchi, A., Fini-Storchi, I., Vergari, W. A., & Ziche, M. (1998). Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*, *90*(8), 587-96. doi:10.1093/jnci/90.8.587
- Gallucci, R. M., Sloan, D. K., Heck, J. M., Murray, A. R., & O'Dell, S. J. (2004). Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J Invest Dermatol*, *122*(3), 764-72. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22323.x
- Gangnuss, S., Cowin, A. J., Daehn, I. S., Hatzirodos, N., Rothnagel, J. A., Varelias, A., & Rayner, T. E. (2004). Regulation of MAPK activation, AP-1 transcription factor expression and keratinocyte differentiation in wounded fetal skin. *J Invest Dermatol*, *122*(3), 791-804. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22319.x
- Gilbert, R. W., Vickaryous, M. K., & Vilorio-Petit, A. M. (2016). Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. *J Dev Biol*, *4*(2). doi:10.3390/jdb4020021
- Gillitzer, R., & Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*, *69*(4), 513-21.
- Godwin, J. W., Pinto, A. R., & Rosenthal, N. A. (2013). Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(23), 9415-20. doi:10.1073/pnas.1300290110
- Greaves, N. S., Ashcroft, K. J., Baguneid, M., & Bayat, A. (2013). Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci*, *72*(3), 206-17. doi:10.1016/j.jdermsci.2013.07.008
- Green, S. J., Scheller, L. F., Marletta, M. A., Seguin, M. C., Klotz, F. W., Slayter, M., . . . Nancy, C. A. (1994). Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett*, *43*(1-2), 87-94. doi:10.1016/0165-2478(94)00158-8
- Gu, B. J., & Wiley, J. S. (2006). Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X7 receptor. *Blood*, *107*(12), 4946-53. doi:10.1182/blood-2005-07-2994
- Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *J Dent Res*, *89*(3), 219-29. doi:10.1177/0022034509359125
- Gursoy, K., Oruc, M., Kankaya, Y., Ulusoy, M. G., Kocer, U., Kankaya, D., . . . Fidanci, V. (2014). Effect of topically applied sildenafil citrate on wound healing: experimental study. *Bosn J Basic Med Sci*, *14*(3), 125-31. doi:10.17305/bjbms.2014.3.48
- Gutierrez-Fernandez, A., Inada, M., Balbin, M., Fueyo, A., Pitiot, A. S., Astudillo, A., . . . Puente, X. S. (2007). Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *FASEB J*, *21*(10), 2580-91. doi:10.1096/fj.06-7860com
- Guzik, T. J., Korbust, R., & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, *54*(4), 469-87.
- Haddow, A. (1972). Molecular repair, wound healing, and carcinogenesis: tumor production a possible overhealing? *Adv Cancer Res*, *16*, 181-234. doi:10.1016/s0065-230x(08)60341-3
- Haines, D. D., Juhasz, B., & Tosaki, A. (2013). Management of multicellular senescence and oxidative stress. *J Cell Mol Med*, *17*(8), 936-57. doi:10.1111/jcmm.12074
- Hambleton, P. (1971). Repair of wall damage in *Escherichia coli* recovered from an aerosol. *J Gen Microbiol*, *69*(1), 81-8. doi:10.1099/00221287-69-1-81
- Han, G., Nguyen, L. N., Macherla, C., Chi, Y., Friedman, J. M., Nosanchuk, J. D., & Martinez, L. R. (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition. *Am J Pathol*, *180*(4), 1465-73. doi:10.1016/j.ajpath.2011.12.013

- Han, Y. P., Yan, C., & Garner, W. L. (2008). Proteolytic activation of matrix metalloproteinase-9 in skin wound healing is inhibited by alpha-1-antichymotrypsin. *J Invest Dermatol*, 128(9), 2334-42. doi:10.1038/jid.2008.77
- Han, Y., Ishibashi, S., Iglesias-Gonzalez, J., Chen, Y., Love, N. R., & Amaya, E. (2018). Ca(2+)-Induced Mitochondrial ROS Regulate the Early Embryonic Cell Cycle. *Cell Rep*, 22(1), 218-231. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.042
- Handly, L. N., & Wollman, R. (2017). Wound-induced Ca(2+) wave propagates through a simple release and diffusion mechanism. *Mol Biol Cell*, 28(11), 1457-66. doi:10.1091/mbc.E16-10-0695
- Harris, R. B. (2014). Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1842(3), 414-23. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.009
- Harrison, M., Abu-Elmagd, M., Grocott, T., Yates, C., Gavrilovic, J., & Wheeler, G. N. (2004). Matrix metalloproteinase genes in *Xenopus* development. *Dev Dyn*, 231(1), 214-20. doi:10.1002/dvdy.20113
- Herrgen, L., Voss, O. P., & Akerman, C. J. (2014). Calcium-dependent neuroepithelial contractions expel damaged cells from the developing brain. *Dev Cell*, 31(5), 599-613. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.012
- Hesketh, M., Sahin, K. B., West, Z. E., & Murray, R. Z. (2017). Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci*, 18(7). doi:10.3390/ijms18071545
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(2), 150-66. doi:10.1038/nrm1569
- Hibbs, J. B., Taintor, R. R., & Vavrin, Z. (1987). Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235(4787), 473-6. doi:10.1126/science.2432665
- Hoffmann, M. H., & Griffiths, H. R. (2018). The dual role of Reactive Oxygen Species in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models. *Free Radic Biol Med*, 125, 62-71. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.016
- Chang, H. Y., Sneddon, J. B., Alizadeh, A. A., Sood, R., West, R. B., Montgomery, K., . . . Brown, P. O. (2004). Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol*, 2(2), E7. doi:10.1371/journal.pbio.0020007
- Chu, A. J. (2011). Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview. *Int J Inflam*, 2011, 367284. doi:10.4061/2011/367284
- Isenberg, J. S., Ridnour, L. A., Espey, M. G., Wink, D. A., & Roberts, D. D. (2005). Nitric oxide in wound-healing. *Microsurgery*, 25(5), 442-51. doi:10.1002/micr.20168
- Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C., . . . Brown, P. O. (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*, 283(5398), 83-7. doi:10.1126/science.283.5398.83
- Jadeski, L. C., & Lala, P. K. (1999). Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am J Pathol*, 155(4), 1381-90. doi:10.1016/S0002-9440(10)65240-6
- Jenkins, D. C., Charles, I. G., Thomsen, L. L., Moss, D. W., Holmes, L. S., Baylis, S. A., . . . Moncada, S. (1995). Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(10), 4392-6. doi:10.1073/pnas.92.10.4392
- Kang, J., Hu, J., Karra, R., Dickson, A. L., Tornini, V. A., Nachtrab, G., . . . Poss, K. D. (2016). Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements. *Nature*, 532(7598), 201-6. doi:10.1038/nature17644

- Karimi, K., Fortriede, J. D., Lotay, V. S., Burns, K. A., Wang, D. Z., Fisher, M. E., . . . Vize, P. D. (2018). Xenbase: a genomic, epigenomic and transcriptomic model organism database. *Nucleic Acids Res*, *46*(D1), D861-D868. doi:10.1093/nar/gkx936
- Kasuya, A., & Tokura, Y. (2014). Attempts to accelerate wound healing. *J Dermatol Sci*, *76*(3), 169-72. doi:10.1016/j.jdermsci.2014.11.001
- Kawakami, K., Kawakami, M., & Puri, R. K. (2004). Nitric oxide accelerates interleukin-13 cytotoxin-mediated regression in head and neck cancer animal model. *Clin Cancer Res*, *10*(15), 5264-70. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0314
- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Seguela, P., . . . Humphrey, P. P. (2001). International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev*, *53*(1), 107-18.
- Khansa, I., C, E. A., & Janis, J. E. (2016). Evidence-Based Scar Management: How to Improve Results with Technique and Technology. *Plast Reconstr Surg*, *138*(3 Suppl), 165S-78S. doi:10.1097/PRS.0000000000002647
- King, A., Balaji, S., Le, L. D., Crombleholme, T. M., & Keswani, S. G. (2014). Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, *3*(4), 315-23. doi:10.1089/wound.2013.0461
- Klyubin, I. V., Kirpichnikova, K. M., & Gamaley, I. A. (1996). Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur J Cell Biol*, *70*(4), 347-51.
- Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, *298* (Pt 2), 249-58. doi:10.1042/bj2980249
- Koh, T. J., & DiPietro, L. A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*, *13*, e23. doi:10.1017/S1462399411001943
- Kopylova, E., Noe, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, *28*(24), 3211-7. doi:10.1093/bioinformatics/bts611
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., & Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, *4*(4), 471-9.
- Krausz, A., & Friedman, A. J. (2015). Nitric oxide as a surgical adjuvant. *Future Sci OA*, *1*(1), FSO56. doi:10.4155/fso.15.56
- Krzyszczczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., & Berthiaume, F. (2018). The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol*, *9*, 419. doi:10.3389/fphys.2018.00419
- Kuiper, J. W., Sun, C., Magalhaes, M. A., & Glogauer, M. (2011). Rac regulates PtdInsP(3) signaling and the chemotactic compass through a redox-mediated feedback loop. *Blood*, *118*(23), 6164-71. doi:10.1182/blood-2010-09-310383
- Kunkemoeller, B., & Kyriakides, T. R. (2017). Redox Signaling in Diabetic Wound Healing Regulates Extracellular Matrix Deposition. *Antioxid Redox Signal*, *27*(12), 823-838. doi:10.1089/ars.2017.7263
- Lakna. (2018). *Difference Between Hemostasis and Homeostasis*. Retrieved November 8, 2019, from <https://pediaa.com/difference-between-hemostasis-and-homeostasis/>
- Lampson, B. L., Kendall, S. D., Ancrile, B. B., Morrison, M. M., Shealy, M. J., Barrientos, K. S., . . . Counter, C. M. (2012). Targeting eNOS in pancreatic cancer. *Cancer Res*, *72*(17), 4472-82. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0057
- Lander, H. M., Sehajpal, P., Levine, D. M., & Novogrodsky, A. (1993). Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol*, *150*(4), 1509-16.
- Lane, A. T. (1986). Human fetal skin development. *Pediatr Dermatol*, *3*(6), 487-91. doi:10.1111/j.1525-1470.1986.tb00656.x

- Larson, B. J., Longaker, M. T., & Lorenz, H. P. (2010). Scarless fetal wound healing: a basic science review. *Plast Reconstr Surg*, *126*(4), 1172-80. doi:10.1097/PRS.0b013e3181eae781
- Lee, R. H., Efron, D., Tantry, U., & Barbul, A. (2001). Nitric oxide in the healing wound: a time-course study. *J Surg Res*, *101*(1), 104-8. doi:10.1006/jsre.2001.6261
- Leibovich, S. J., & Ross, R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*, *78*(1), 71-100.
- Leiper, L. J., Walczysko, P., Kucerova, R., Ou, J., Shanley, L. J., Lawson, D., . . . Collinson, J. M. (2006). The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6^{+/-} mouse model of epithelial wound-healing delay. *BMC Biol*, *4*, 27. doi:10.1186/1741-7007-4-27
- Levigne, D., Modarressi, A., Krause, K. H., & Pittet-Cuenod, B. (2016). NADPH oxidase 4 deficiency leads to impaired wound repair and reduced dityrosine-crosslinking, but does not affect myofibroblast formation. *Free Radic Biol Med*, *96*, 374-84. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.194
- Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, *69*(2), 262-91. doi:10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005
- Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, *27*(21), 2987-93. doi:10.1093/bioinformatics/btr509
- Li, H., Handsaker, B., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., . . . Subgroup, 1. G. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078-9. doi:10.1093/bioinformatics/btp352
- Li, J., Zhang, S., & Amaya, E. (2016). The cellular and molecular mechanisms of tissue repair and regeneration as revealed by studies in *Xenopus*. *Regeneration (Oxf)*, *3*(4), 198-208. doi:10.1002/reg2.69
- Li, J., Zhang, S., Soto, X., Woolner, S., & Amaya, E. (2013). ERK and phosphoinositide 3-kinase temporally coordinate different modes of actin-based motility during embryonic wound healing. *J Cell Sci*, *126*(Pt 21), 5005-17. doi:10.1242/jcs.133421
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*(7), 923-30. doi:10.1093/bioinformatics/btt656
- Lin, Z., Altaf, N., Li, C., Chen, M., Pan, L., Wang, D., . . . Ji, Y. (2018). Hydrogen sulfide attenuates oxidative stress-induced NLRP3 inflammasome activation via S-sulfhydrating c-Jun at Cys269 in macrophages. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, *1864*(9 Pt B), 2890-900. doi:10.1016/j.bbadis.2018.05.023
- Liu, F., Chen, D. D., Sun, X., Xie, H. H., Yuan, H., Jia, W., & Chen, A. F. (2014). Hydrogen sulfide improves wound healing via restoration of endothelial progenitor cell functions and activation of angiopoietin-1 in type 2 diabetes. *Diabetes*, *63*(5), 1763-78. doi:10.2337/db13-0483
- Loot, M. A., Kenter, S. B., Au, F. L., van Galen, W. J., Middelkoop, E., Bos, J. D., & Mekkes, J. R. (2002). Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol*, *81*(3), 153-60. doi:10.1078/0171-9335-00228
- Loots, M. A., Lamme, E. N., Zeegelaar, J., Mekkes, J. R., Bos, J. D., & Middelkoop, E. (1998). Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol*, *111*(5), 850-7. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00381.x
- Lopez-Rivera, E., Lizarbe, T. R., Martinez-Moreno, M., Lopez-Novoa, J. M., Rodriguez-Barbero, A., Rodrigo, J., . . . Zaragoza, C. (2005). Matrix metalloproteinase 13

- mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(10), 3685-90. doi:10.1073/pnas.0408217102
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, *15*(12), 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- Love, N. R., Chen, Y., Ishibashi, S., Kritsiligkou, P., Lea, R., Koh, Y., . . . Amaya, E. (2013). Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol*, *15*(2), 222-8. doi:10.1038/ncb2659
- Lovvorn, H. N., Cheung, D. T., Nimni, M. E., Perelman, N., Estes, J. M., & Adzick, N. S. (1999). Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. *J Pediatr Surg*, *34*(1), 218-23. doi:10.1016/s0022-3468(99)90261-0
- Lu, Y., Jingyan, G., Baorong, S., Peng, J., Xu, Y., & Cai, S. (2012). Expression of EGFR, Her2 predict lymph node metastasis (LNM)-associated metastasis in colorectal cancer. *Cancer Biomark*, *11*(5), 219-26. doi:10.3233/CBM-2012-00282
- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., . . . Eming, S. A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol*, *184*(7), 3964-77. doi:10.4049/jimmunol.0903356
- Lun, A. T., Riesenfeld, S., Andrews, T., Dao, T. P., Gomes, T., participants in the 1st Human Cell Atlas, J., & Marioni, J. C. (2019). EmptyDrops: distinguishing cells from empty droplets in droplet-based single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol*, *20*(1), 63. doi:10.1186/s13059-019-1662-y
- Malone-Povolny, M. J., Maloney, S. E., & Schoenfish, M. H. (2019). Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. *Adv Healthc Mater*, *8*(12), e1801210. doi:10.1002/adhm.201801210
- Martin, P., & Nobes, C. D. (1992). An early molecular component of the wound healing response in rat embryos--induction of c-fos protein in cells at the epidermal wound margin. *Mech Dev*, *38*(3), 209-15. doi:10.1016/0925-4773(92)90054-n
- Martin, P., D'Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R., & McKercher, S. R. (2003). Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol*, *13*(13), 1122-8. doi:10.1016/s0960-9822(03)00396-8
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, *6*, 13. doi:10.12703/P6-13
- Mastej, K., & Adamiec, R. (2008). Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol*, *45*(3), 183-90. doi:10.1007/s00592-008-0040-0
- McCall, T. B., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1992). Interleukin-8 inhibits the induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, *186*(2), 68-5. doi:10.1016/0006-291x(92)90800-z
- McCarthy, D., Campbell, K., Lun, A., & Willis, Q. (2017). Scater: pre-processing, quality control, normalisation and visualisation of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics*, *33*(8), 1179-86. doi:10.1093/bioinformatics/btw777
- McCarty, S. M., & Percival, S. L. (2013). Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, *2*(8), 438-447. doi:10.1089/wound.2012.0370
- McInnes, L., Healy, J., Saul, N., & Großberger, L. (2018). UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection. *J Open Source Softw*, *3*(29), 861. doi:10.21105/joss.00861
- Mehebig, N., Jaubert, A. M., Sabourault, D., Giudicelli, Y., & Ribiere, C. (2005). Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and

- MAP kinase activation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(2), C379-87. doi:10.1152/ajpcell.00320.2004
- Minns, M. S., Teicher, G., Rich, C. B., & Trinkaus-Randall, V. (2016). Purinoreceptor P2X7 Regulation of Ca(2+) Mobilization and Cytoskeletal Rearrangement Is Required for Corneal Reepithelialization after Injury. *Am J Pathol*, 186(2), 285-96. doi:10.1016/j.ajpath.2015.10.006
- Mohan, S., Hamuro, M., Sorescu, G. P., Koyoma, K., Sprague, E. A., Jo, H., . . . Natarajan, M. (2003). IkappaBalpha-dependent regulation of low-shear flow-induced NF-kappa B activity: role of nitric oxide. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(4), C1039-47. doi:10.1152/ajpcell.00464.2001
- Mujoo, K., Sharin, V. G., Martin, E., Choi, B. K., Sloan, C., Nikonoff, L. E., . . . Murad, F. (2010). Role of soluble guanylyl cyclase-cyclic GMP signaling in tumor cell proliferation. *Nitric Oxide*, 22(1), 43-50. doi:10.1016/j.niox.2009.11.007
- Naora, Y., Hishida, Y., Fukazawa, T., Kunieda, T., & Kubo, T. (2013). Expression analysis of XPhyH-like during development and tail regeneration in *Xenopus* tadpoles: possible role of XPhyH-like expressing immune cells in impaired tail regenerative ability. *Biochem Biophys Res Commun*, 431(2), 152-7. doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.005
- Nieuwkoop, P., & Faber, J. (1994). *Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis*. Garland Publishing Inc.
- Otsuka-Yamaguchi, R., Kawasumi-Kita, A., Kudo, N., Izutsu, Y., Tamura, K., & Yokoyama, H. (2017). Cells from subcutaneous tissues contribute to scarless skin regeneration in *Xenopus laevis* froglets. *Dev Dyn*, 246(8), 585-97. doi:10.1002/dvdy.24520
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3), 221-33. doi:10.1038/nrm2125
- Pantano, L. (2017). DEGREport: Report of DEG analysis. doi:doi:10.18129/B9.bioc.DEGreport
- Park, H. S., Mo, J. S., & Choi, E. J. (2006). Nitric oxide inhibits an interaction between JNK1 and c-Jun through nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 351(1), 281-6. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.034
- Pedersen, T. X., Leethanakul, C., Patel, V., Mitola, D., Lund, L. R., Dano, K., . . . Bugge, T. H. (2003). Laser capture microdissection-based in vivo genomic profiling of wound keratinocytes identifies similarities and differences to squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 22(25), 3964-76. doi:10.1038/sj.onc.1206614
- Petrie, T. A., Strand, N. S., Yang, C. T., Rabinowitz, J. S., & Moon, R. T. (2014). Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development*, 141(13), 2581-91. doi:10.1242/dev.098459
- Pozhitkov, A. E., Neme, R., Domazet-Loso, T., Leroux, B. G., Soni, S., Tautz, D., & Noble, P. A. (2017). Tracing the dynamics of gene transcripts after organismal death. *Open Biol*, 7(1). doi:10.1098/rsob.160267
- Praetorius, H. A., & Leipziger, J. (2009). ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signal*, 5(4), 433-46. doi:10.1007/s11302-009-9146-2
- Qing, C. (2017). The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chin J Traumatol*, 20(4), 189-193. doi:10.1016/j.cjte.2017.06.001
- Razzell, W., Evans, I. R., Martin, P., & Wood, W. (2013). Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Curr Biol*, 23(5), 424-9. doi:10.1016/j.cub.2013.01.058

- Ridiandries, A., Tan, J. T., & Bursill, C. A. (2018). The Role of Chemokines in Wound Healing. *Int J Mol Sci*, *19*(10). doi:10.3390/ijms19103217
- Riss, J., Khanna, C., Koo, S., Chandramouli, G. V., Yang, H. H., Hu, Y., . . . Barrett, J. C. (2006). Cancers as wounds that do not heal: differences and similarities between renal regeneration/repair and renal cell carcinoma. *Cancer Res*, *66*(14), 7216-24. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0040
- Robert, J., & Ohta, Y. (2009). Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Dev Dyn*, *238*(6), 1249-70. doi:10.1002/dvdy.21891
- Rodgers, P. A., Vreman, H. J., Dennery, P. A., & Stevenson, D. K. (1994). Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies. *Semin Perinatol*, *18*(1), 2-10.
- Rolfe, K. J., & Grobbelaar, A. O. (2012). A review of fetal scarless healing. *ISRN Dermatol*, *698034*, 2012. doi:10.5402/2012/698034
- Saidkhani, V., Asadzaker, M., Khodayar, M. J., & Latifi, S. M. (2016). The effect of nitric oxide releasing cream on healing pressure ulcers. *Iran J Nurs Midwifery Res*, *21*(3), 322-30. doi:10.4103/1735-9066.180389
- Salimian Rizi, B., Achreja, A., & Nagrath, D. (2017). Nitric Oxide: The Forgotten Child of Tumor Metabolism. *Trends Cancer*, *3*(9), 659-672. doi:10.1016/j.trecan.2017.07.005
- Savage, B., Saldivar, E., & Ruggeri, Z. M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*, *84*(2), 289-97. doi:10.1016/s0092-8674(00)80983-6
- Sawai, T., Usui, N., Sando, K., Fukui, Y., Kamata, S., Okada, A., . . . Kimata, K. (1997). Hyaluronic acid of wound fluid in adult and fetal rabbits. *J Pediatr Surg*, *32*(1), 41-3. doi:10.1016/s0022-3468(97)90089-0
- Sessa, W. C. (2009). Molecular control of blood flow and angiogenesis: role of nitric oxide. *J Thromb Haemost*, *7 Suppl 1*, 35-7. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03424.x
- Schafer, M., & Werner, S. (2007). Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *23*, 69-92. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123609
- Schafer, M., & Werner, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(8), 628-38. doi:10.1038/nrm2455
- Schaffer, M. R., Tantry, U., Gross, S. S., Wasserburg, H. L., & Barbul, A. (1996). Nitric oxide regulates wound healing. *J Surg Res*, *63*(1), 237-40. doi:10.1006/jsre.1996.0254
- Signorelli, S. S., Malaponte, G., Libra, M., Di Pino, L., Celotta, G., Bevelacqua, V., . . . Mazzarino, M. C. (2005). Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vasc Med*, *10*(1), 1-6. doi:10.1191/1358863x05vm582oa
- Simon, C. M., Vaughan, E. M., Bement, W. M., & Edelstein-Keshet, L. (2013). Pattern formation of Rho GTPases in single cell wound healing. *Mol Biol Cell*, *24*(3), 421-32. doi:10.1091/mbc.E12-08-0634
- Smith, K. A., Waypa, G. B., & Schumacker, P. T. (2017). Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. *Redox Biol*, *13*, 228-34. doi:10.1016/j.redox.2017.05.020
- Smith, T., Heger, A., & Sudbery, I. (2017). UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res*, *27*(3), 491-499. doi:10.1101/gr.209601.116
- Sonnemann, K. J., & Bement, W. M. (2011). Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *27*, 237-63. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154251
- Soto, X., Li, J., Lea, R., Dubaissi, E., Papalopulu, N., & Amaya, E. (2013). Inositol kinase and its product accelerate wound healing by modulating calcium levels, Rho

- GTPases, and F-actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(27), 11029-34. doi:10.1073/pnas.1217308110
- Spitler, R., Schwappacher, R., Wu, T., Kong, X., Yokomori, K., Pilz, R. B., . . . Berns, M. W. (2013). Nitrosyl-cobinamide (NO-Cbi), a new nitric oxide donor, improves wound healing through cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Cell Signal*, 25(12), 2374-82. doi:10.1016/j.cellsig.2013.07.029
- Stallmeyer, B., Anhold, M., Wetzler, C., Kahlina, K., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2002). Regulation of eNOS in normal and diabetes-impaired skin repair: implications for tissue regeneration. *Nitric Oxide*, 6(2), 168-77. doi:10.1006/niox.2001.0407
- Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K., & Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*, 175(1), 342-9. doi:10.4049/jimmunol.175.1.342
- Stuehr, D. J., & Nathan, C. F. (1989). Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*, 169(5), 1543-55. doi:10.1084/jem.169.5.1543
- Sudbeck, B. D., Pilcher, B. K., Welgus, H. G., & Parks, W. C. (1997). Induction and repression of collagenase-1 by keratinocytes is controlled by distinct components of different extracellular matrix compartments. *J Biol Chem*, 272(35), 22103-10.
- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., . . . Mendelsohn, M. E. (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science*, 286(5444), 1583-7.
- Szabo, C. (2016). Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 15(3), 185-203. doi:10.1038/nrd.2015.1
- Szubinska, B. (1971). "New membrane" formation in Amoeba proteus upon injury of individual cells. Electron microscope observations. *J Cell Biol*, 49(3), 747-72. doi:10.1083/jcb.49.3.747
- Tadokoro, S., Ide, S., Tokuyama, R., Umeki, H., Tatehara, S., Kataoka, S., & Satomura, K. (2015). Leptin promotes wound healing in the skin. *PLoS One*, 10(3), e0121242. doi:10.1371/journal.pone.0121242
- Takagi, T., Naito, Y., Uchiyama, K., Mizuhima, K., Suzuki, T., Horie, R., . . . Yoshikawa, T. (2016). Carbon monoxide promotes gastric wound healing in mice via the protein kinase C pathway. *Free Radic Res*, 50(10), 1098-1105. doi:10.1080/10715762.2016.1189546
- Thiruvoth, F., Mohapatra, D., Kumar, D., Chittoria, S., & Nandhagopal, V. (2015). Current concepts in the physiology of adult wound healing. *Plast Aesthet Res*, 2, 250-6. doi:10.4103/2347-9264.158851
- Tchaikovski, V., Olieslagers, S., Bohmer, F. D., & Waltenberger, J. (2009). Diabetes mellitus activates signal transduction pathways resulting in vascular endothelial growth factor resistance of human monocytes. *Circulation*, 120(2), 150-9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.817528
- Tomankova, S. (2018). Úloha oxidu dusnatého (NO) v průběhu embryonálního vývoje pokožky drápatky vodní. Praha: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova.
- Tomankova, S., Abaffy, P., & Sindelka, R. (2017). The role of nitric oxide during embryonic epidermis development of *Xenopus laevis*. *Biol Open*, 6(6), 862-871. doi:10.1242/bio.023739
- Tomlinson, M. L., Garcia-Morales, C., Abu-Elmagd, M., & Wheeler, G. N. (2008). Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during

- embryonic development. *Mech Dev*, 125(11-12), 1059-70. doi:10.1016/j.mod.2008.07.005
- van den Brink, S. C., Sage, F., Vertesy, A., Spanjaard, B., Peterson-Maduro, J., Baron, C. S., . . . van Oudenaarden, A. (2017). Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nat Methods*, 14(10), 935-936. doi:10.1038/nmeth.4437
- van der Vliet, A., & Janssen-Heininger, Y. M. (2014). Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? *J Cell Biochem*, 115(3), 427-35. doi:10.1002/jcb.24683
- Vatanserver, F., de Melo, W. C., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., . . . Hamblin, M. R. (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev*, 37(6), 955-89. doi:10.1111/1574-6976.12026
- Vodovotz, Y., Chesler, L., Chong, H., Kim, S. J., Simpson, J. T., DeGraff, W., . . . Barcellos-Hoff, M. H. (1999). Regulation of transforming growth factor beta1 by nitric oxide. *Cancer Res*, 59(9), 2142-9.
- Volkman, D., & Baluska, F. (1999). Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks. *Microsc Res Tech*, 47(2), 135-54. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19991015)47:2<135::AID-JEMT6>3.0.CO;2-1
- Wang, B., Xiong, Q., Shi, Q., Le, X., Abbruzzese, J. L., & Xie, K. (2001). Intact nitric oxide synthase II gene is required for interferon-beta-mediated suppression of growth and metastasis of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 61(1), 71-5.
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J*, 16(13), 1792-8. doi:10.1096/fj.02-0211hyp
- Wang, X., Zhang, Y., Chang, Y., Duan, D., Sun, Z., & Guo, X. (2016). Elevation of IGFBP2 contributes to mycotoxin T-2-induced chondrocyte injury and metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*, 471(1), 385-391. doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.042
- Wei, D., Richardson, E. L., Zhu, K., Wang, L., Le, X., He, Y., . . . Xie, K. (2003). Direct demonstration of negative regulation of tumor growth and metastasis by host-inducible nitric oxide synthase. *Cancer Res*, 63(14), 3855-9.
- Weigert, A., & Brune, B. (2008). Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide*, 19(2), 95-102. doi:10.1016/j.niox.2008.04.021
- Werner, S., Breeden, M., Hubner, G., Greenhalgh, D. G., & Longaker, M. T. (1994). Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol*, 103(4), 469-73. doi:10.1111/1523-1747.ep12395564
- West, D. C., Shaw, D. M., Lorenz, P., Adzick, N. S., & Longaker, M. T. (1997). Fibrotic healing of adult and late gestation fetal wounds correlates with increased hyaluronidase activity and removal of hyaluronan. *Int J Biochem Cell Biol*, 29(1), 201-10. doi:10.1016/s1357-2725(96)00133-1
- Whiteman, M., Armstrong, J. S., Chu, S. H., Jia-Ling, S., Wong, B. S., Cheung, N. S., . . . Moore, P. K. (2004). The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem*, 90(3), 765-8. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02617.x
- Wilgus, T. A., Roy, S., & McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2(7), 379-388. doi:10.1089/wound.2012.0383
- Witte, M. B., & Barbul, A. (2002). Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg*, 183(4), 406-12. doi:10.1016/s0002-9610(02)00815-2

- Witte, M. B., Kiyama, T., & Barbul, A. (2002). Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes. *Br J Surg*, *89*(12), 1594-601. doi:10.1046/j.1365-2168.2002.02263.x
- Witte, M. B., Thornton, F. J., Efron, D. T., & Barbul, A. (2000). Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. *Nitric Oxide*, *4*(6), 572-82. doi:10.1006/niox.2000.0307
- Wood, P. J., Sansom, J. M., Butler, S. A., Stratford, I. J., Cole, S. M., Szabo, C., . . . Adams, G. E. (1994). Induction of hypoxia in experimental murine tumors by the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine. *Cancer Res*, *54*(24), 6458-63.
- Wood, P. J., Stratford, I. J., Adams, G. E., Szabo, C., Thiemermann, C., & Vane, J. R. (1993). Modification of energy metabolism and radiation response of a murine tumour by changes in nitric oxide availability. *Biochem Biophys Res Commun*, *192*(2), 505-10. doi:10.1006/bbrc.1993.1444
- Wu, Y. E., Pan, L., Zuo, Y., Li, X., & Hong, W. (2017). Detecting Activated Cell Populations Using Single-Cell RNA-Seq. *Neuron*, *96*(2), 313-329 e6. doi:10.1016/j.neuron.2017.09.026
- Xing, Q., Zhang, L., Redman, T., Qi, S., & Zhao, F. (2015). Nitric oxide regulates cell behavior on an interactive cell-derived extracellular matrix scaffold. *J Biomed Mater Res A*, *103*(12), 3807-14. doi:10.1002/jbm.a.35524
- Xu, M., Hua, Y., Qi, Y., Meng, G., & Yang, S. (2019). Exogenous hydrogen sulphide supplement accelerates skin wound healing via oxidative stress inhibition and vascular endothelial growth factor enhancement. *Exp Dermatol*, *28*(7), 776-785. doi:10.1111/exd.13930
- Yakovlev, V. A., Barani, I. J., Rabender, C. S., Black, S. M., Leach, J. K., Graves, P. R., . . . Mikkelsen, R. B. (2007). Tyrosine nitration of IkappaBalpha: a novel mechanism for NF-kappaB activation. *Biochemistry*, *46*(42), 11671-83. doi:10.1021/bi701107z
- Yamaguchi, A., Sakuma, K., Fujikawa, T., & Morita, I. (2013). Expression of specific IGFBPs is associated with those of the proliferating and differentiating markers in regenerating rat plantaris muscle. *J Physiol Sci*, *63*(1), 71-77. doi:10.1007/s12576-012-0227-6
- Yamakawa, S., & Hayashida, K. (2019). Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns Trauma*, *7*, 10. doi:10.1186/s41038-019-0148-1
- Yang, T., Zelikin, A. N., & Chandrawati, R. (2018). Progress and Promise of Nitric Oxide-Releasing Platforms. *Adv Sci (Weinh)*, *5*(6), 1701043. doi:10.1002/advs.201701043
- Yokoyama, H., Maruoka, T., Aruga, A., Amano, T., Ohgo, S., Shiroishi, T., & Tamura, K. (2011). Prx-1 expression in *Xenopus laevis* scarless skin-wound healing and its resemblance to epimorphic regeneration. *J Invest Dermatol*, *131*(12), 2477-85. doi:10.1038/jid.2011.223
- Yoo, S. K., Freisinger, C. M., LeBert, D. C., & Huttenlocher, A. (2012). Early redox, Src family kinase, and calcium signaling integrate wound responses and tissue regeneration in zebrafish. *J Cell Biol*, *199*(2), 225-34. doi:10.1083/jcb.201203154
- Yoo, S. K., Starnes, T. W., Deng, Q., & Huttenlocher, A. (2011). Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature*, *480*(7375), 109-12. doi:10.1038/nature10632
- Yoshii, Y., Noda, M., Matsuzaki, T., & Ihara, S. (2005). Wound healing ability of *Xenopus laevis* embryos. I. Rapid wound closure achieved by bisectonal half embryos. *Dev Growth Differ*, *47*(8), 553-61. doi:10.1111/j.1440-169X.2005.00830.x
- Zeiber, A. M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, B., & Busse, R. (1995). Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res*, *76*(6), 980-6. doi:10.1161/01.res.76.6.980

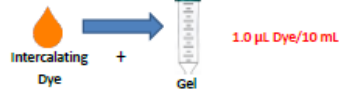
- Zhan, R., Yang, S., He, W., Wang, F., Tan, J., Zhou, J., . . . Luo, G. (2015). Nitric oxide enhances keratinocyte cell migration by regulating Rho GTPase via cGMP-PKG signalling. *PLoS One*, *10*(3), e0121551. doi:10.1371/journal.pone.0121551
- Zhang, R., Wang, L., Zhang, L., Chen, J., Zhu, Z., Zhang, Z., & Chopp, M. (2003). Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ Res*, *92*(3), 308-13.
- Zhang, Y., Gong, L. H., Zhang, H. Q., Du, Q., You, J. F., Tian, X. X., & Fang, W. G. (2010). Extracellular ATP enhances in vitro invasion of prostate cancer cells by activating Rho GTPase and upregulating MMPs expression. *Cancer Lett*, *293*(2), 189-97. doi:10.1016/j.canlet.2010.01.010
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, *372*(6505), 425-32. doi:10.1038/372425a0
- Zhao, H., Lu, S., Chai, J., Zhang, Y., Ma, X., Chen, J., . . . Liu, Y. (2017). Hydrogen sulfide improves diabetic wound healing in ob/ob mice via attenuating inflammation. *J Diabetes Complications*, *31*(9), 1363-1369. doi:10.1016/j.jdiacomp.2017.06.011
- Zheng, B., Jiang, J., Chen, Y., Lin, M., Du, Z., Xiao, Y., . . . Yan, F. (2017). Leptin Overexpression in Bone Marrow Stromal Cells Promotes Periodontal Regeneration in a Rat Model of Osteoporosis. *J Periodontol*, *88*(8), 808-818. doi:10.1902/jop.2017.170042
- Zomer, H. D., & Trentin, A. G. (2018). Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J Dermatol Sci*, *90*(1), 3-12. doi:10.1016/j.jdermsci.2017.12.009
- Zykova, S. N., Jenssen, T. G., Berdal, M., Olsen, R., Myklebust, R., & Seljelid, R. (2000). Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like db/db mice. *Diabetes*, *49*(9), 1451-8. doi:10.2337/diabetes.49.9.1451

8. Prílohy

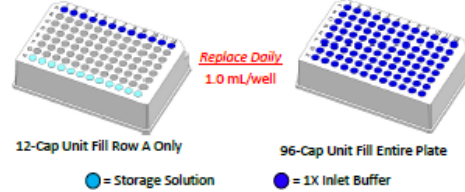
8.1. Fragment Analyzer Standard Sensitivity RNA analysis kit manuál

Preparation:

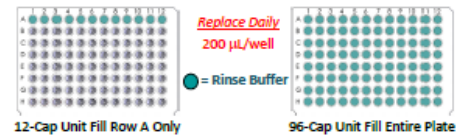
1. Mix fresh Gel and Dye. Refill 1X Conditioning Solution as needed.



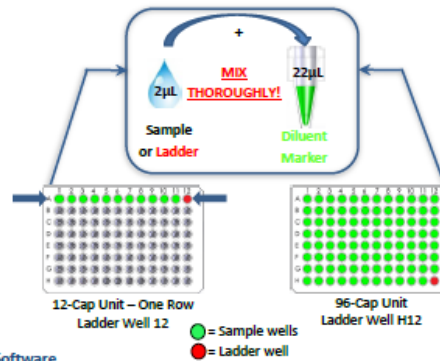
2. Place a fresh 1X Inlet Buffer Tray on Fragment Analyzer.




3. Place Rinse Buffer plate in Marker Drawer location.



4. Heat denature Samples and Ladder at 70°C for 2 minutes, immediately cool to 4°C and keep on ice before use.
5. Mix Samples or Ladder with Diluent Marker in Sample Plate, add 24 µL of Blank Solution to unused wells.



Software

1. Select Tray and Row to run for 12-Cap or Tray for 96-Cap.
2. Enter Sample ID and Tray ID (optional).
3. Select "Add to Queue", select the DNF-471-33 (or 55) - 5S Total RNA 15nt method from the Dropdown menu.
4. Enter Tray Name, Folder Prefix, and Notes (optional), Select OK to add Method to the Queue.
5. Select  to Start the Separation.

8.2. NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module manual

Starting Material: 1–5 µg of DNA-free total RNA.

1. Dilute the total RNA with nuclease-free water to a final volume of 50 µl in a nuclease-free 0.2 ml PCR tube.
2. In a second nuclease-free 0.2 ml PCR tube aliquot 20 µl of well resuspended NEBNext Magnetic Oligo d(T)₂₅ Beads.
3. Wash the beads by adding 100 µl of RNA binding buffer to the beads. Pipette the entire volume up and down 6 times to mix thoroughly.
4. Place the tube on the magnetic rack at room temperature for 2 minutes or until the solution is clear.
5. Remove and discard all of the supernatant from the tube. Take care not to disturb the beads.
6. Remove the tube from the magnetic rack.
7. Repeat steps 3–6 once for a total of 2 washes.
8. Resuspend the beads in 50 µl of RNA Binding Buffer and add the 50 µl of total RNA sample from step 1. Pipette the entire volume up and down to mix thoroughly.
9. Place the tubes on the thermal cycler and heat the sample at 65°C for 5 minutes and hold at 4°C to denature the RNA and facilitate binding of the poly-A-RNA to the beads.
10. Remove tubes from the thermal cycler when the temperature reaches 4°C.
11. Resuspend the beads. Pipette up and down slowly 6 times to mix thoroughly.
12. Place the tubes on the bench and incubate at room temperature for 5 minutes to allow the RNA to bind to the beads.
13. Resuspend the beads. Pipette up and down slowly 6 times to mix thoroughly.
14. Incubate for 5 more minutes on the bench at room temperature to allow the RNA to bind to the beads.
15. Place the tubes on the magnetic rack at room temperature for 2 minutes or until the solution is clear to separate the poly-A RNA bound to the beads from the solution.
16. Remove and discard all of the supernatant. Take care not to disturb the beads.
17. Remove the tubes from the magnetic rack.
18. Wash the beads by adding 200 µl of Wash Buffer to remove unbound RNA. Pipette the entire volume up and down 6 times to mix thoroughly.
19. Place the tubes on the magnetic rack at room temperature for 2 minutes or until the solution is clear.
20. Remove and discard all the supernatant from each well of the plate. Take care not to disturb the beads.
21. Remove the tubes from the magnetic rack.
22. Repeat Steps 18-21.
23. Add 50 µl of Tris Buffer to each tube. Gently pipette the entire volume up and down 6 times to mix thoroughly.
24. Place the tubes on the thermal cycler. Close the lid and heat the sample at 80°C for 2 minutes, then hold at 25°C to elute the poly-A RNA from the beads.
25. Remove the tubes from the thermal cycler when the temperature reaches 25°C.
26. Add 50 µl of RNA Binding Buffer to each sample to allow the RNA to bind to the same beads. Gently pipette the entire volume up and down 6 times to mix thoroughly.
27. Incubate the tubes on the bench at room temperature for 5 minutes.
28. Resuspend the beads. Pipette up and down slowly 6 times to mix thoroughly.
29. Incubate the tubes on the bench at room temperature for 5 more minutes to allow the RNA to bind to the beads.
30. Place the tubes on the magnetic stand at room temperature for 2 minutes or until the solution is clear.
31. Remove and discard all of the supernatant from each tube. Take care not to disturb the beads.
32. Remove the tubes from the magnetic rack.
33. Wash the beads once with 200 µl of Wash Buffer. Gently pipette the entire volume up and down 6 times to mix thoroughly.
34. Place the tubes on the magnetic rack at room temperature for 2 minutes or until the solution is clear.
35. Remove and discard all of the supernatant from each tube. Take care not to disturb the beads.


Note: It is important to remove all of the supernatant to successfully use the RNA in downstream steps. Spin down the tube. Place the tube on the magnetic rack and with a 10

µl tip remove all of the wash buffer. (Caution: Do not disturb beads that contain the mRNA).



36. Remove the tubes from the magnetic rack.
37. Elute the mRNA from the beads by adding 17 µl of the Tris Buffer, mix by pipetting 6 times and incubating the sample at 80°C for 2 minutes, then hold at 25°C to elute the polyA RNA from the beads. Immediately, place the tubes on the magnetic rack for 2 minutes or until the solution is clear.
38. Collect the purified mRNA by transferring the supernatant to a clean nuclease-free PCR Tube.
39. Place tube on ice.

8.3. NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina manual

3.1 RNA Fragmentation, Priming and First Strand cDNA Synthesis

 RNA fragmentation is only required for intact or partially degraded RNA. Recommended fragmentation times can be found in Table 3.1. Follow protocol in 3.1A to set up the reaction. For highly degraded RNA (FFPE Samples) which do not require fragmentation proceed to Step 3.1B.

3.1A RNA Fragmentation and Priming Starting from Intact or Partially Degraded RNA:

1. Set up the following reaction and mix by gentle pipetting:
Purified mRNA or Ribosome depleted RNA (10-100 ng) 5 µl
 (pink) NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (5X) 4 µl
 (pink) Random Primers 1 µl

Final Volume 10 µl


2.  Incubate the sample at 94°C following the recommendations in Table 3.1 for fragments sizes ~200 nt.

Table 3.1. Suggested fragmentation times based on RIN number of RNA input.

RNA TYPE	RIN	FRAG. TIME
Intact RNA	>7	15 min. at 94°C
Partially Degraded RNA	2–6	7–8 min. at 94°C

3. Refer to Appendix A for fragmentation conditions if you are preparing libraries with large inserts (> 200 bp). Conditions in Appendix A only apply for intact RNA.



4. Transfer the tube to ice.

First Strand cDNA Synthesis

Dilute Actinomycin D stock solution (5 µg/µl) to 0.1 µg/µl in nuclease free water for immediate use.


Note: Dilute solutions of Actinomycin D are very sensitive to light. In solution, Actinomycin D tends to absorb to plastic and glass. For these reasons, unused dilute solutions should be discarded and not stored for further use. However, frozen aliquots of a concentrated stock solution (5 µg/µl) in DMSO are expected to be stable for at least a month at -20°C.

4. To the fragmented and primed mRNA from Step 3 in Section 3.1A (10 µl) add the following components and mix by gentle pipetting:

-  (pink) Murine RNase Inhibitor 0.5 µl
- Actinomycin D (0.1 µg/µl) 5 µl
-  (pink) ProtoScript II Reverse Transcriptase 1 µl
- Nuclease free water 3.5 µl

Final volume 20 µl

Note: If you are following recommendations in Appendix A, for longer RNA fragments, increase the incubation at 42°C from 15 minutes to 50 minutes in Step 5.

5.  Incubate the sample in a preheated thermal cycler (with the heated lid set at 105°C) as follows:
10 minutes at 25°C
15 minutes at 42°C

15 minutes at 70°C

Hold at 4°C

6. Proceed directly to Second Strand cDNA Synthesis, Section 3.2.

3.2 Perform Second Strand cDNA Synthesis

1. Add the following reagents to the First Strand Synthesis reaction (20 µl):

Nuclease-free water 48 µl

● (orange) Second Strand Synthesis Reaction Buffer (10X) 8 µl

● (orange) Second Strand Synthesis Enzyme Mix 4 µl

Total volume 80 µl

2. Mix thoroughly by gentle pipetting.
3. Incubate in a thermal cycler for 1 hour at 16°C, with heated lid set at ≤ 40°C.

3.3 Purify the Double-stranded cDNA Using 1.8X Agencourt AMPure XP Beads

1. Vortex AMPure XP Beads to resuspend.
2. Add 144 µl (1.8X) of resuspended AMPure XP Beads to the second strand synthesis reaction (~80 µl). Mix well on a vortex mixer or by pipetting up and down at least 10 times.
3. Incubate for 5 minutes at room temperature.
4. Quickly spin the tube in a microcentrifuge to collect any sample on the sides of the tube. Place the tube on an appropriate magnetic rack to separate beads from supernatant. After the solution is clear (about 5 minutes), carefully remove and discard the supernatant. Be careful not to disturb the beads that contain DNA targets.
5. Add 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to the tube while in the magnetic rack. Incubate at room temperature for 30 seconds, and then carefully remove and discard the supernatant.
6. Repeat Step 5 once for a total of 2 washing steps.
7. Air dry the beads for 5 minutes while the tube is on the magnetic rack with lid open.
Caution: Do not over dry the beads. This may result in lower recovery of DNA target.
8. Remove the tube from the magnet. Elute the DNA target from the beads into 60 µl 0.1X TE Buffer or 10 mM Tris-HCl. Mix well on a vortex mixer or by pipetting up and down. Quickly spin the tube and incubate for 2 minutes at room temperature. Place the tube in the magnetic rack until the solution is clear.
9. Remove 55.5 µl of the supernatant and transfer to a clean nuclease free PCR tube.



Note: If you need to stop at this point in the protocol samples can be stored at -20°C.

3.4 Perform End Prep of cDNA Library

1. Mix the following components in a sterile nuclease free tube:
Purified double-stranded cDNA (Step 9, Section 2.7) 55.5 µl
● (green) NEBNext End Repair Reaction Buffer (10X) 6.5 µl
● (green) NEBNext End Prep Enzyme Mix 3 µl

Total volume 65 µl

2. Incubate the sample in a thermal cycler (with the heated lid set at 75°C) as follows:
30 minutes at 20°C
30 minutes at 65°C
Hold at 4°C
3. Proceed immediately to Adaptor Ligation.

3.5 Perform Adaptor Ligation

Dilute the ● (red) NEBNext Adaptor* for Illumina (15 µM) to 1.5 µM with a 10-fold dilution (1:9) with 10 mM Tris-HCl and 10 mM NaCl for immediate use.

1. Add the following components directly to the End Prep Reaction (**Caution: Do not pre-mix the components to prevent adaptor-dimer formation**):

End Prep Reaction 65 µl


● (red) Blunt/TA Ligase Master Mix 15 µl

Diluted NEBNext Adaptor* 1 µl

Nuclease-free Water 2.5 µl

Total volume 83.5 µl

2. Mix by pipetting followed by a quick spin to collect all liquid from the sides of the tube.
3. Incubate 15 minutes at 20°C in a thermal cycler.

 **A precipitate can form upon thawing of the NEBNext Hot Start HiFi PCR Master Mix. To ensure optimal performance, place the master mix at room temperature while purifying the ligation reaction. Once thawed, gently mix by inverting the tube several times.**

3.6 Purify the Ligation Reaction Using AMPure XP Beads

 **Note: If you are selecting for larger size fragments (> 200 nt) follow the size selection recommendations in Appendix A, Chapter 4.**

1. Add nuclease-free water to the ligation reaction to bring the reaction volume to 100 µl. It is important to ensure the final volume is 100 µl prior to adding AMPure XP Beads.
Note: X refers to the original sample volume of 100 µl from the above step.
2. Add 100 µl (1.0X) resuspended AMPure XP Beads and mix well on a vortex mixer or by pipetting up and down at least 10 times.
3. Incubate for 5 minutes at room temperature.
4. Quickly spin the tube in a microcentrifuge and place the tube on an appropriate magnetic rack to separate beads from the supernatant. After the solution is clear (about 5 minutes), discard the supernatant that contain unwanted fragments (**Caution: do not discard the beads**).
5. Add 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to the tube while in the magnetic rack. Incubate at room temperature for 30 seconds, and then carefully remove and discard the supernatant.
6. Repeat Step 5 once for a total of 2 washing steps.
7. Briefly spin the tube, and put the tube back in the magnetic rack.
8. Completely remove the residual ethanol, and air dry beads for 5 minutes while the tube is on the magnetic rack with the lid open.
Caution: Do not over dry the beads. This may result in lower recovery of DNA target.
9. Remove the tube from the magnet. Elute DNA target from the beads with 52 µl 0.1X TE or 10 mM Tris-HCl. Mix well on a vortex mixer or by pipetting up and down, incubate for 2 minutes at room temperature. Put the tube in the magnetic rack until the solution is clear.
10. Transfer the 50 µl supernatant to a clean PCR tube. Discard beads.
11. To the 50 µl supernatant, add 50 µl (1.0X) of the resuspended AMPure XP Beads and mix well on a vortex mixer or by pipetting up and down at least 10 times.
12. Incubate for 5 minutes at room temperature.
13. Quickly spin the tube in a microcentrifuge and place the tube on an appropriate magnetic rack to separate beads from the supernatant. After the solution is clear (about 5 minutes), discard the supernatant that contains unwanted fragments (**Caution: do not discard the beads**).
14. Add 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to the tube while in the magnetic rack. Incubate at room temperature for 30 seconds, and then carefully remove and discard the supernatant.
15. Repeat Step 14 once for a total of 2 washing steps.
16. Briefly spin the tube, and put the tube back in the magnetic rack.
17. Completely remove the residual ethanol, and air dry beads for 5 minutes while the tube is on the magnetic rack with the lid open.
Caution: Do not over dry the beads. This may result in lower recovery of DNA target.
18. Remove the tube from the magnet. Elute DNA target from the beads with 19 µl 0.1X TE or 10 mM Tris-HCl. Mix well on a vortex mixer or by pipetting up and down, incubate for 2 minutes at room temperature. Put the tube in the magnetic rack until the solution is clear.
19. Without disturbing the bead pellet, transfer 17 µl of the supernatant to a clean PCR tube and proceed to PCR enrichment.

3.7 PCR Enrichment of Adaptor Ligated DNA

- To the cDNA (17 µl) from Step 19 Section 3.6 add the following components and mix by gentle pipetting:
 - (blue) NEBNext USER Enzyme 3 µl
 - (blue) NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix 25 µl
 - (blue) Index (X) Primer/i7 Primer*, ** 2.5 µl
 - (blue) Universal PCR Primer/i5 Primer*, *** 2.5 µl

Total volume 50 µl

- PCR Cycling Conditions

CYCLE STEP	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
USER Digestion	37°C	15 minutes	1
Initial Denaturation	98°C	30 seconds	1
Denaturation	98°C	10 seconds	12–15*, **
Annealing/Extension	65°C	75 seconds	
Final Extension	65°C	5 minutes	1
Hold	4°C	∞	

- * The number of PCR cycles should be adjusted based on RNA input. If 10 ng enriched RNA is the starting input, it is recommended to perform 15 cycles of PCR.

** It is important to limit the number of PCR cycles to avoid overamplification. If overamplification occurs, larger molecular weight products (> 500 bp) will appear on the Bioanalyzer trace.
- Proceed to Section 3.8 (Purify the PCR Reaction using Agencourt AMPure XP Beads).

3.8 Purify the PCR Reaction using Agencourt AMPure XP Beads

- Vortex Agencourt AMPure XP Beads to resuspend.
- Add 45 µl (0.9X) of resuspended Agencourt AMPure XP Beads to the PCR reaction (~ 50 µl). Mix well on a vortex mixer or by pipetting up and down at least 10 times.
- Incubate for 5 minutes at room temperature.
- Quickly spin the tube in a microcentrifuge and place the tube on an appropriate magnetic rack to separate beads from the supernatant. After the solution is clear (about 5 minutes), carefully remove and discard the supernatant. Be careful not to disturb the beads that contain DNA targets.
- Add 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to the tube while in the magnetic rack. Incubate at room temperature for 30 seconds, and then carefully remove and discard the supernatant.
- Repeat Step 5 once for a total of 2 washing steps.
- Air dry the beads for 5 minutes while the tube is on the magnetic rack with the lid open.
Caution: Do not overdry the beads. This may result in lower recovery of DNA target.
- Remove the tube from the rack. Elute the DNA target from the beads into 23 µl 0.1X TE. Mix well on a vortex mixer or by pipetting up and down, quickly spin the tube in a microcentrifuge and incubate for 2 minutes at room temperature. Place it in the magnetic rack until the solution is clear.
- Transfer 20 µl of the supernatant to a clean PCR tube, and store at –20°C.

8.4. Lexogen Poly(A) RNA Selection Kit manual

Standard Input (>500 - 5 µg)	Lower Input (≤500 ng)	High Input (50 - 100 µg)
Aliquot and Wash Beads		
<input type="checkbox"/> Wash 10 µl beads (MB ●) twice with 75 µl BW ○.		<input type="checkbox"/> Wash 50 - 100 µl beads (MB ●) twice with ≥200 µl BW ○.
<input type="checkbox"/> Withdraw supernatant.		
<input type="checkbox"/> Resuspend beads with 10 µl HYB ●.		<input type="checkbox"/> Resuspend beads with 50 - 100 µl HYB ●.
Denature RNA		
<input type="checkbox"/> Prepare total RNA in a volume of 10 µl.		<input type="checkbox"/> Prepare total RNA in a volume of 50 - 100 µl.
<input type="checkbox"/> Incubate for 1 min at 60 °C, hold at 25 °C.		
Hybridize Poly(A) RNA		
<input type="checkbox"/> Add denatured RNA (10 µl) to washed beads (10 µl).		<input type="checkbox"/> Add denatured RNA (50-100 µl) to washed beads (50-100 µl).
<input type="checkbox"/> Incubate for 20 min at 25 °C / 1,250 rpm.		
<input type="checkbox"/> Wash 2 x for 5 min at 25 °C / 1,250 rpm with 100 µl BW ○.		<input type="checkbox"/> Wash 2 x for 5 min at 25 °C / 1,250 rpm with ≥200 µl BW ○.
<input type="checkbox"/> Withdraw supernatant.		
Elute Poly(A) RNA		
<input type="checkbox"/> Add 25 µl H₂O ●.	<input type="checkbox"/> For ≤500 ng: Add 12 µl H₂O ●.	<input type="checkbox"/> For >5 µg: Add up to 50 µl H₂O ●.
<input type="checkbox"/> Incubate for 1 min at 70 °C.		
<input type="checkbox"/> Place on magnet for 5 min or until supernatant is clear.		
<input type="checkbox"/> Transfer the clear supernatant into a fresh tube. 🖱️ Safe stopping point.		

8.5. Lexogen SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit manual

<input type="checkbox"/>	Mix 8 µl RNA, 5 µl ST ● and 14 µl RTL ●. REMARK: Use 009UG102 for FFPE / degraded RNA!	Reverse Transcription and Ligation
<input type="checkbox"/>	Heat for 3 min at 94 °C, then cool to 25 °C. REMARK: Use 009UG102 for FFPE / degraded RNA!	
<input type="checkbox"/>	Incubate for 15 min at 25 °C.	
<input type="checkbox"/>	Add 3 µl E1 ●, mix well and incubate for 2 min at 25 °C.	
<input type="checkbox"/>	Raise temp. to 37 °C and incubate for 1 h (OPTIONAL: 2 h).	
<input type="checkbox"/>	Heat for 5 min at 70 °C to inactivate the enzymes. ⚡ Safe stopping point.	
<input type="checkbox"/>	Pre-mix 18 µl SSM ○ and 2 µl E2 ○ per reaction, mix well.	Second Strand Synthesis
<input type="checkbox"/>	Add 20 µl SSM / E2 mix directly to the RT / lig reaction, mix well.	
<input type="checkbox"/>	Incubate: 98 °C / 90 sec, 65 °C / 60 sec, 72 °C / 5 min , 4 °C / ∞. ⚡ Safe stopping point.	
<input type="checkbox"/>	Add 15 µl PB +µl BD ● +µl PS (see p.27), mix well, incubate 5 min at RT. REMARK: For FFPE / degraded RNA use 009UG102!	Purification
<input type="checkbox"/>	Place on magnet for 2 - 5 min, remove and discard supernatant.	
<input type="checkbox"/>	Add 30 µl EB , remove from magnet, mix well, incubate 2 min at RT.	
<input type="checkbox"/>	Add 42 µl PS , mix well, incubate 5 min at RT.	
<input type="checkbox"/>	Place on magnet for 2 - 5 min, remove and discard supernatant.	
<input type="checkbox"/>	Rinse the beads twice with 120 µl 80 % EtOH, 30 sec.	
<input type="checkbox"/>	Air dry beads for 5 - 10 min. ATTENTION: Do not let the beads dry too long!	
<input type="checkbox"/>	Add 20 µl EB , remove from magnet, mix well, incubate 2 min at RT..	
<input type="checkbox"/>	Place on magnet for 2 - 5 min, transfer 17 µl of the supernatant into a fresh PCR plate (see p.25 for qPCR). ⚡ Safe stopping point.	

Prepare a mastermix with 7 μ l **PCR** and 1 μ l **E2** per reaction, mix well.


Add 8 μ l **PCR / E2** premix to 17 μ l of each purified library.

Add 5 μ l i7 Primer (**7001-7096**, from the 96-well plate) for each reaction, mix well. **ATTENTION:** Reseal opened index wells after usage!

PCR: 98 °C, 30 sec PCR

98 °C, 10 sec
65 °C, 20 sec
72 °C, 30 sec } 17 - 19x
(see p.23 and p.27)

72 °C, 1 min

10 °C, ∞ .  Safe stopping point.

Add 27 μ l **PB** per reaction, mix well, incubate 5 min. **REMARK:** Use 009UG102 for FFPE / degraded RNA!

Place on magnet for 2 - 5 min, remove, and discard supernatant.

Add 30 μ l **EB**, remove from magnet, mix well, incubate 2 min at RT.


Add 30 μ l **PS**, mix well, incubate 5 min at RT. **REMARK:** Use 009UG102 for FFPE / degraded RNA!

Place on magnet for 2 - 5 min, remove, and discard supernatant. Purification

Rinse the beads twice with 120 μ l 80 % EtOH, 30 sec.

Air dry beads for 5 - 10 min. **ATTENTION:** Do not let the beads dry too long!

Add 20 μ l **EB**, remove from magnet, mix well, incubate 2 min at RT.

Place on magnet for 2 - 5 min, transfer 15 - 17 μ l of the supernatant into a fresh PCR plate.  Safe stopping point.

8.6. Lexogen QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina manual

Standard Input	Low Input (≤ 10 ng) / Low Quality / FFPE
First Strand cDNA Synthesis	
<input type="checkbox"/> Mix 5 μ l RNA and 5 μ l FS1 ●.	<input type="checkbox"/> Skip! Place RNA samples at room temp.
<input type="checkbox"/> Incubate for 3 min at 85 °C, then cool to 42 °C. Keep samples on thermocycler at 42 °C!	<input type="checkbox"/> Skip!
<input type="checkbox"/> Prepare a mastermix with 9.5 μ l FS2 ● and 0.5 μ l E1 ● per reaction, mix well and pre-warm for 2 - 3 min at 42 °C.	<input type="checkbox"/> Prepare a mastermix with 5 μ l FS1 ●, 9.5 μ l FS2 ●, and 0.5 μ l E1 ● per reaction, mix well and pre-warm for 2 - 3 min at 42 °C.
<input type="checkbox"/> Add 10 μ l FS2 / E1 mix per reaction, mix well. Keep samples on thermocycler at 42 °C when adding mastermix!	<input type="checkbox"/> Add 15 μ l FS1 / FS2 / E1 mix per sample, mix well and spin down. Transfer samples to thermocycler at 42 °C!
<input type="checkbox"/> Incubate for 15 min at 42 °C. Proceed immediately to RNA Removal!	<input type="checkbox"/> Incubate for 15 min (or 1 hr) at 42 °C. Proceed immediately to RNA Removal!
RNA Removal	
<input type="checkbox"/> Add 5 μ l RS ○ (or RS-GB ●), mix well.	<input type="checkbox"/> Add 5 μ l RS ○ (or RS-GB ●), mix well.
<input type="checkbox"/> Incubate 10 min at 95 °C, cool to 25 °C.	<input type="checkbox"/> For ≤ 10 ng: Incubate 10 min at 95 °C; or for ≤ 1 ng: Incubate 5 min at 95 °C; then cool to 25 °C.
Second Strand Synthesis	
<input type="checkbox"/> Add 10 μ l SS1 ● (or USS ●), mix well.	
<input type="checkbox"/> Incubate 1 min at 98 °C, slowly ramp down to 25 °C (0.5 °C / sec).	
<input type="checkbox"/> Incubate 30 min at 25 °C.	
<input type="checkbox"/> Prepare a mastermix with 4 μ l SS2 ● and 1 μ l E2 ● per reaction, mix well.	
<input type="checkbox"/> Add 5 μ l SS2 / E2 mix per reaction, mix well.	
<input type="checkbox"/> Incubate 15 min at 25 °C. 📌 Safe stopping point.	
Purification	
<input type="checkbox"/> Add 16 μ l PB per reaction, mix well, incubate 5 min at RT.	
<input type="checkbox"/> Place on magnet for 2 - 5 min, discard supernatant.	
<input type="checkbox"/> Add 40 μ l EB , remove from magnet, mix well, incubate 2 min at RT.	
<input type="checkbox"/> Add 56 μ l PS , mix well, incubate 5 min at RT.	<input type="checkbox"/> For low input / low quality / FFPE: Add 48 μ l PS , mix well, incubate 5 min at RT.
<input type="checkbox"/> Place on magnet for 2 - 5 min, discard supernatant.	
<input type="checkbox"/> Rinse beads twice with 120 μ l 80 % EtOH, 30 sec.	
<input type="checkbox"/> Air dry beads for 5 - 10 min. ATTENTION: Do not let the beads dry too long!	
<input type="checkbox"/> Add 20 μ l EB , remove from magnet, mix well, incubate 2 min at RT.	
<input type="checkbox"/> Place on magnet for 2 - 5 min, transfer 17 μ l of the supernatant into a fresh PCR plate. 📌 Safe stopping point.	

Standard Input**Low Input (≤ 10 ng) / Low Quality / FFPE****qPCR [Strongly Recommended! Requires PCR Add-on Kit (Cat. No. 020.96)]**

- Add 2 μ l of **EB** to the 17 μ l of eluted cDNA.
Prepare a 2.5x stock of SYBR Green I nucleic acid stain (i.e., 1:4,000 dilution in DMSO; use Sigma-Aldrich, Cat. No. S9430).
- Combine 1.7 μ l of cDNA with: 7 μ l **PCR** ●, 5 μ l Primer **7000**, and 1 μ l **E** ● (from PCR Add-on Kit), 1.2 μ l of 2.5x SYBR Green I nucleic acid stain, and 14.1 μ l of **EB**, and per reaction. Mix well.
- PCR: 98 °C, 30 sec.

98 °C, 10 sec	}	35x (see p.25)
65 °C, 20 sec		
72 °C, 30 sec		
72 °C, 1 min		
10 °C, ∞ . Calculate the optimal cycle number for Endpoint PCR (see Appendix E, p.25).		

Endpoint PCR

- Prepare a mastermix with 7 μ l **PCR** ● and 1 μ l **E3** ● per reaction, mix well.
- Add 8 μ l **PCR** / **E3** mastermix to 17 μ l of each purified library.
- Add 5 μ l i7 Primer (**7001-7096**, from the 96-well plate) for each reaction, mix well.
ATTENTION: Reseal opened index wells after usage!
- PCR: 98 °C, 30 sec

98 °C, 10 sec	}	11 - 25x (see p.25)	ATTENTION: Increased cycle numbers may be required for low input / low quality / FFPE RNA (see Appendices C, p.23 and D, p.24)
65 °C, 20 sec			
72 °C, 30 sec			
72 °C, 1 min			
10 °C, ∞ . Safe stopping point.			

Purification

- Add 30 μ l **PB** per reaction, mix well, incubate 5 min at RT.
- Place on magnet for 2 - 5 min, discard supernatant.
- Add 30 μ l **EB**, remove from magnet, mix well, incubate 2 min at RT.
- Add 30 μ l **PS**, mix well, incubate 5 min at RT.
- Place on magnet for 2 - 5 min, discard supernatant.
- Rinse the beads twice with 120 μ l 80 % EtOH, 30 sec.
- Air dry beads for 5 - 10 minutes. **ATTENTION:** Do not let the beads dry too long!
- Add 20 μ l **EB**, remove from magnet, mix well, incubate 2 min at RT.
- Place on magnet for 2 - 5 min, transfer 15 - 17 μ l of the supernatant into a fresh PCR plate.
 Safe stopping point.

For low input / low quality / FFPE: Add 27 μ l **PB** per reaction, mix well, incubate 5 min at RT.

8.7. QIAGEN Plasmid midi kit manual

Notes before starting

- Add RNase A solution to Buffer P1, mix and store at 2–8°C.
- **Optional:** Add LyseBlue® reagent to Buffer P1 at a ratio of 1:1000.
- Prechill Buffer P3 at 4°C. Check Buffer P2 for SDS precipitation.
- Isopropanol and 70% ethanol are required.
- Symbols: ● QIAGEN Plasmid Mini Kit; ▲ QIAGEN Plasmid Midi Kit; and ■ QIAGEN Plasmid Maxi Kit.

1. Harvest overnight bacterial culture by centrifuging at 6000 x g for 15 min at 4°C.
2. Resuspend the bacterial pellet in ● 0.3 ml, ▲ 4 ml or ■ 10 ml Buffer P1.
3. Add ● 0.3 ml, ▲ 4 ml or ■ 10 ml Buffer P2, mix thoroughly by vigorously inverting 4–6 times and incubate at room temperature (15–25°C) for 5 min. If using LyseBlue reagent, the solution will turn blue.
4. Add ● 0.3 ml, ▲ 4 ml or ■ 10 ml prechilled Buffer P3, mix thoroughly by vigorously inverting 4–6 times. Incubate on ice for ● 5 min, ▲ 15 min or ■ 20 min. If using LyseBlue reagent, mix the solution until it is colorless.
5. ●: Centrifuge at 14,000–18,000 x g for 10 min at 4°C. Re-centrifuge if the supernatant is not clear. ▲ and ■: Centrifuge at ≥20,000 x g for 30 min at 4°C. Re-centrifuge the supernatant at ≥20,000 x g for 15 min at 4°C.
6. Equilibrate a QIAGEN-tip ● 20, ▲ 100 or ■ 500 by applying ● 1 ml, ▲ 4 ml or ■ 10 ml Buffer QBT, and allow column to empty by gravity flow.
7. Apply the supernatant from step 5 to the QIAGEN-tip and allow it to enter the resin by gravity flow.
8. Wash the QIAGEN-tip with ● 2 x 2 ml, ▲ 2 x 10 ml or ■ 2 x 30 ml Buffer QC. Allow Buffer QC to move through the QIAGEN-tip by gravity flow.
9. Elute DNA with ● 0.8 ml, ▲ 5 ml or ■ 15 ml Buffer QF into a clean ● 2 ml, ▲ 15 ml or ■ 50 ml vessel. For constructs larger than 45 kb, prewarming the elution buffer to 65°C may help to increase the yield.
10. Precipitate DNA by adding ● 0.56 ml, ▲ 3.5 ml or ■ 10.5 ml (0.7 volumes) room-temperature isopropanol to the eluted DNA and mix. Centrifuge at ≥15,000 x g for 30 min at 4°C. Carefully decant the supernatant.
11. Wash the DNA pellet with ● 1 ml, ▲ 2 ml or ■ 5 ml room-temperature 70% ethanol and centrifuge at ≥15,000 x g for 10 min. Carefully decant supernatant.
12. Air-dry pellet for 5–10 min and redissolve DNA in a suitable volume of appropriate buffer (e.g., TE buffer, pH 8.0, or 10 mM Tris·Cl, pH 8.5).

8.8. SureCell WTA 3' Library Prep Kit for the ddSEQ System manual

Prepare, Count, and Assess Viability of Single-Cell Suspension

- 1 Dissociate cells for the cell or tissue type you are using.
- 2 If using adherent cells, neutralize the trypsin by adding 4x the volume.
- 3 Wash cells once in cold 1X PBS + 0.1% BSA at a volume sufficient to remove carryover components.
- 4 Centrifuge briefly and resuspend cells in appropriate volume of cold 1X PBS + 0.1% BSA.
- 5 Pipette cell suspension through the chilled cell filter and transfer filtered cells from the cell filter tube.
- 6 Use a microscope or automated cell counter to assess cell dissociation, viability, and concentration.
- 7 If cells are not dissociated to single-cell suspension, mix thoroughly with a P200 or P1000 pipette, as appropriate.
- 8 Dilute the stock cell preparation to target 2500 cells/ μ l in 1X PBS + 0.1% BSA solution.

Prepare Cell and Barcode Suspension Mixes

- 1 Combine the following components (red caps) in a 1.7 ml tube. Pipette 10–15 times while on ice, then briefly centrifuge.

Cell Enzyme Mix Component	Volume (μ l) for 1 Cartridge (4 Samples)	Volume (μ l) for 2 Cartridges (8 Samples)
Cell Suspend Buffer	60	120
DTT	8	16
RNA Stabilizer	6	12
RT Enzyme	13.2	26.4
Enhancer Enzyme	12	24
Total	99.2	198.4

- 2 Create the Cell Suspension Mix by combining the following components in a 1.7 ml tube on ice. Vortex the cells for 1 second, repeat.

Cell Suspension Mix Component	Volume (μ l) per Sample	Volume (μ l) for 1 Cartridge (4 Samples)	Volume (μ l) for 2 Cartridges (8 Samples)
Cell Enzyme Mix	21.5	86	172
Filtered Cells (2500 cells/ μ l)	4.5	18	36

- 3 Create the Barcode Suspension Mix by combining the following components (blue caps) in a 1.7 ml tube on ice. Vortex for 1 second, repeat, then immediately add to the Barcode Buffer.

Barcode Suspension Mix Component	Volume (μ l) for 1 Cartridge (4 Samples)	Volume (μ l) for 2 Cartridges (8 Samples)
Barcode Buffer	60	120
3' Barcode Mix	60	120

Isolate Single Cells

- 1 Add 25 μ l of ddSEQ Priming Solution to each well of an 8-tube strip.
- 2 Add 20 μ l of ddSEQ Priming Solution to each well of the second row of the cartridge.
- 3 Allow the ddSEQ Priming Solution to remain in wells for 1 minute, then remove.
- 4 Vortex the Barcode Suspension Mix for 1 second, repeat.
- 5 Load 20 μ l of the Barcode Suspension Mix into the bottom of the **B** ports (Blue).
- 6 Vortex the Cell Suspension Mix for 1 second, repeat.
- 7 Load 20 μ l of Cell Suspension Mix into the bottom of the red ports, numbered 1–4.
- 8 Load 80 μ l of Encapsulation Oil into each well of the bottom row of the cartridge labeled OIL.
- 9 Keep the loaded cartridge for single cell isolation on the ddSEQ Single-Cell Isolator.
- 10 Open the ddSEQ Single-Cell Isolator and place the cartridge holder into the instrument.
- 11 Close the instrument to initiate single-cell isolation.
- 12 Remove the cartridge holder from the ddSEQ Single-Cell Isolator.
- 13 Chill a 96-well plate on a chilled 96-well cooling block.
- 14 Gently aspirate all encapsulated sample from the output wells.
- 15 Dispense the encapsulated sample into the corresponding column of the plate.
- 16 Cover sample wells and keep on the 96-well cooling block.

- 17 If you are processing a second cartridge, proceed to *Prepare Cartridge* on page 1.
- 18 If you have finished processing cartridges, proceed to *Reverse Transcribe Samples* on page 2.

Reverse Transcribe Samples

- 1 Place the 96-well plate on the thermal cycler and run the RT program.
- 2 Bring Purification Beads (SPB) to room temperature.

Break Emulsion

- 1 Remove the 96-well plate from the thermal cycler.
- 2 Examine the samples ensuring they all have equal volumes.
- 3 Remove the 8-tube strip caps to avoid cross-sample contamination.
- 4 Add 20 μ l of Droplet Disruptor above each sample.
- 5 Wait 30 seconds, then add 100 μ l of water above each sample.

Clean Up First Strand Synthesis

- 1 Vortex Purification Beads (SPB) until well-dispersed.
- 2 Add 90 μ l Purification Beads (SPB) to the samples by dispensing above the aqueous layer without mixing.
- 3 Pipette mix Purification Beads (SPB) *in the aqueous layer only* until the layer is evenly distributed.
- 4 Incubate at room temperature for 10 minutes.
- 5 Place on a magnetic peg stand.
- 6 Remove and discard all supernatant Use a fresh pipette tip to go into the well again to discard more supernatant.
- 7 Wash with 80% EtOH, incubate on the magnetic peg stand for 30 seconds, then remove all supernatant from each well. Repeat.
- 8 Seal the plate and centrifuge at $280 \times g$ for 10 seconds.
- 9 Place on a magnetic peg stand and wait 30 seconds.
- 10 Remove residual 80% EtOH from each well.
- 11 Air-dry on the magnetic peg stand for 5 minutes.
- 12 Remove the sample plate from the magnetic peg stand.
- 13 35 μ l Resuspension Buffer (RSB) to each sample well. Pipette to mix, making sure all beads are resuspended.
- 14 Incubate at room temperature for 2 minutes.
- 15 Seal the plate and centrifuge at $280 \times g$ for 10 seconds.

- 16 Place on a DynaMag 96 side magnet and wait 2 minutes.
- 17 Combine the 2 wells for each sample into a single well by transferring 34 μ l of supernatant from each sample well to a new plate, as follows.
 - ▶ Sample 1, rows A—B to row A of the corresponding column in the new plate.
 - ▶ Sample 2, rows C—D to row B of the corresponding column in the new plate.
 - ▶ Sample 3, rows E—F to row C of the corresponding column in the new plate.
 - ▶ Sample 4, rows G—H to row D of the corresponding column in the new plate.

Synthesize Second Strand cDNA

- 1 Prepare Second Strand Synthesis Master Mix by adding the following to a 1.7 ml tube on ice. Pipette to mix.

Second Strand Synthesis Component	Volume (µl) for 1 Cartridge (4 Samples)	Volume (µl) for 2 Cartridges (8 Samples)
Second Strand Buffer (SSB)	36	72
Second Strand Enzyme (SSE)	18	36

- 2 Add 12 µl of Second Strand Master Mix to each sample well.
- 3 Pipette to thoroughly mix each sample well.
- 4 Centrifuge at 280 × g for 10 seconds.
- 5 Place on the thermal cycler and run the Second Strand Synthesis (SSS) program.

SAFE STOPPING POINT

If you are stopping, leave the plate on the thermal cycler at 4°C overnight or store at -25°C to -15°C for up to 2 days.

Clean Up cDNA

- 1 Centrifuge sample plate at 280 × g for 30 seconds.
- 2 Vortex Purification Beads (SPB) until well-dispersed.
- 3 Add 44 µl Purification Beads (SPB) to each sample well. Pipette mix until evenly distributed.
- 4 Incubate at room temperature for 5 minutes.
- 5 Place on a magnetic peg stand until the liquid is clear.
- 6 Remove and discard all supernatant from each well.
- 7 Wash 2 times with 200 µl 80% EtOH.
- 8 Air-dry on the magnetic peg stand for 5 minutes.
- 9 Remove residual 80% EtOH from each well.
- 10 Remove from the magnetic peg stand.
- 11 Add 11 µl Resuspension Buffer (RSB) to each sample well. Pipette to mix, making sure all beads are resuspended.
- 12 Incubate at room temperature for 2 minutes.
- 13 Seal the plate and centrifuge at 280 × g for 10 seconds.
- 14 Place on a DynaMag 96 side magnet and wait until the liquid is clear.
- 15 Transfer 10 µl of supernatant from each sample well to a new 96-well plate.
- 16 Run 1 µl of undiluted library on an Agilent Technology 2100 Bioanalyzer using a High Sensitivity DNA chip.
- 17 Drag the blue regions to capture the 200-8000 bp range.
- 18 Record the cDNA library fragment size and cDNA yield.

Tagment cDNA

- 1 Prepare Tagmentation Mix in a 1.7 ml tube on ice as follows. Pipette to mix.

Tagmentation Mix Component	Volume (µl) for 1 Cartridge (4 Samples)	Volume (µl) for 2 Cartridges (8 Samples)
Tagment Buffer (TCB)	88	176
Tagment Enzyme (TCE)	44	88

- 2 Add 30 µl of Tagmentation Mix to each sample well. Mix.
- 3 Centrifuge at 280 × g for 10 seconds.
- 4 Place on the thermal cycler and run the TGM program.
- 5 Remove the plate from the thermal cycler as soon as the temperature reaches 4°C.
- 6 Remove the seal to avoid cross-sample contamination.
- 7 Add 10 µl of Tagment Stop Buffer to each well. Pipette to mix.
- 8 Centrifuge at 280 × g for 10 seconds.
- 9 Incubate at room temperature for 5 minutes.

Amplify Tagmented cDNA

- 1 Arrange the DNA Adapters in a tube rack. Use a different index for each sample well. Record.
- 2 Add 30 μ l of Tagmentation PCR Mix (TPM) to each of the tagmented samples.
- 3 Add 10 μ l of Tagment PCR Adapter (TPP1) to each of the tagmented samples.
- 4 Add 10 μ l of each DNA Adapter to each tagmented sample.
- 5 Pipette to mix.
- 6 Seal the plate and centrifuge at 280 \times g at 20°C for 30 seconds.
- 7 Place on the thermal cycler and run the LA program.

SAFE STOPPING POINT

If you are stopping, leave the plate on the thermal cycler at 4°C overnight or store at -25°C to -15°C for up to 2 days.

Clean Up Libraries

- 1 Centrifuge sample plate at 280 \times g for 30 seconds.
- 2 Vortex Purification Beads (SPB) until well-dispersed.
- 3 Add 58 μ l of Purification Beads (SPB) to each sample well. Pipette to mix, making sure that all beads are resuspended.
- 4 Incubate at room temperature for 5 minutes.
- 5 Place on a magnetic peg stand until the liquid is clear.
- 6 Remove and discard all supernatant from each well.
- 7 Wash 2 times with 200 μ l 80% EtOH.
- 8 Remove residual 80% EtOH from each well.
- 9 Air-dry on the magnetic peg stand for 5 minutes.
- 10 Remove from the magnetic peg stand.
- 11 Add 51 μ l of Resuspension Buffer (RSB) to each sample well. Pipette mix until beads are thoroughly resuspended.
- 12 Incubate at room temperature for 2 minutes.
- 13 Centrifuge at 280 \times g for 10 seconds to bring entire solution to the bottom of the well.
- 14 Place on a DynaMag 96 side magnet until the liquid is clear.
- 15 Transfer 50 μ l of supernatant from each sample well to a new sample 96-well plate.
- 16 Vortex Purification Beads (SPB) until well-dispersed.
- 17 Add 30 μ l of Purification Beads (SPB) to each sample well. Pipette until evenly distributed.
- 18 Incubate at room temperature for 5 minutes.

- 19 Place on a magnetic peg stand until the liquid is clear.
- 20 Remove and discard all supernatant from each well.
- 21 Wash 2 times with 200 μ l 80% EtOH.
- 22 Remove residual 80% EtOH from each well.
- 23 Air-dry on the magnetic peg stand for 5 minutes.
- 24 Remove the 96-well plate from the magnetic peg stand.
- 25 Add 22 μ l Resuspension Buffer (RSB) to each sample well. Pipette mix until beads are resuspended.
- 26 Incubate at room temperature for 2 minutes.
- 27 Seal the plate and centrifuge at 280 \times g for 10 seconds to bring entire solution to the bottom of the well.
- 28 Place on a DynaMag 96 side magnet until the liquid is clear.
- 29 Transfer 20 μ l of supernatant from each sample well to a new 96-well plate.

SAFE STOPPING POINT

If you are stopping, seal the plate and store at -25°C to -15°C for up to 7 days.

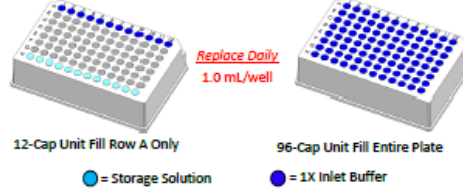
8.9. Fragment Analyzer High Sensitivity NGS kit manual

Preparation:

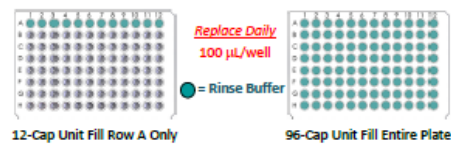
1. Mix fresh Gel and Dye. Refill 1X Conditioning Solution as needed.



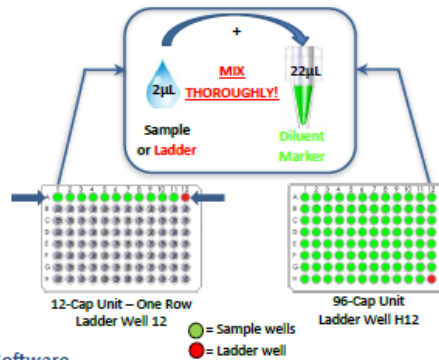
2. Place a fresh 1X Inlet Buffer Tray on Fragment Analyzer.



3. Place Rinse Buffer plate in Marker Drawer location.



4. Mix Samples or Ladder with Diluent Marker in Sample Plate, add 24 µL of Blank Solution to unused wells.



Software

1. Select Tray and Row to run for 12-Cap or Tray for 96-Cap.
2. Enter Sample ID and Tray ID (optional).
3. Select "Add to Queue", select the DNF-474-33 (or 55) - HS NGS Fragment 1-6000bp method from the Dropdown menu.
4. Enter Tray Name, Folder Prefix, and Notes (optional), Select OK to add Method to the Queue.
5. Select to Start the Separation.