

MAGDALENA CHADZIŃSKA, MONIKA IDZIK

Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej
Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński
Ingardena 6, 30-060 Kraków
E-mail: magdalena.chadzinska@uj.edu.pl

BEZKRĘGOWCE I KRĘGOWCE ZMIENNOCIĘPLNE JAKO MODELE W BADANIACH CHORÓB ZAKAŻNYCH I REAKCJI IMMUNOLOGICZNYCH

WSTĘP

Dwudziesty wiek przyniósł szereg obwarowań etycznych dotyczących użycia w badaniach naukowych zwierząt, co spowodowało wzrost zainteresowania badaniami *in vitro*, z wykorzystaniem pozaustrojowych hodowli komórek i tkanek. Niestety wyniki badań *in vitro* dość często słabo korelują z wynikami badań *in vivo*. Główną przyczyną tego stanu rzeczy jest znaczne uproszczenie środowiska badań w modelach *in vitro*, podczas gdy w badaniach *in vivo* na dany parametr wpływają nie tylko bodźce/czynniki wprowadzane przez badacza, ale również całe skomplikowane środowisko fizjologiczne organizmu. Obecnie, układy *in vitro* stosowane są na pierwszym etapie badań, kolejne etapy są natomiast przeprowadzane w warunkach *in vivo*, na specjalnie dobranych modelach. W tym miejscu warto wspomnieć, że zwierzęta używane jako modele w badaniach naukowych powinny się charakteryzować: (i) małymi rozmiarami ciała (ich hodowla nie powinna wymagać dużo miejsca oraz powinna być stosunkowo prosta i tania w utrzymaniu), (ii) wysoką płodnością (duża liczba osobników pozwala na wiarygodną analizę statystyczną

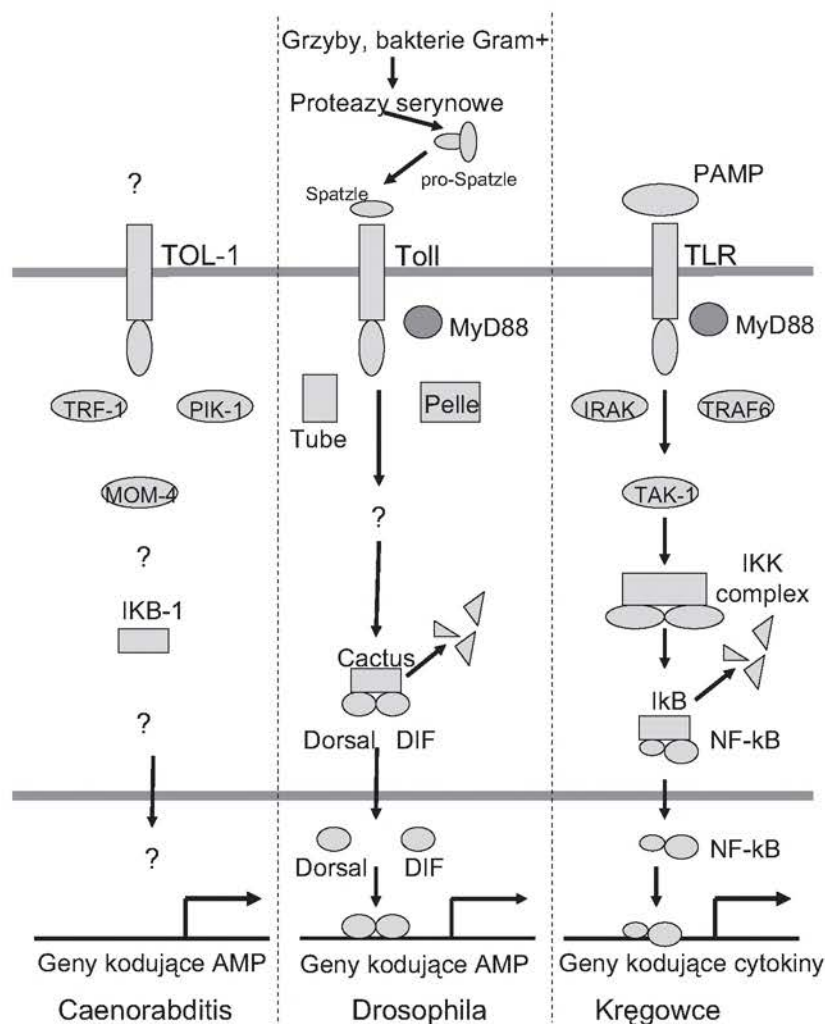
otrzymanych wyników), (iii) krótkim cyklem życiowym (umożliwia to m.in. obserwacje wzorów dziedziczenia w kolejnych pokoleniach), (iv) dostępnością informacji i technik badawczych właściwych dla danego gatunku.

Aczkolwiek większość badań o charakterze biologicznym i medycznym przeprowadzana jest wciąż z użyciem gryzoni (myszy, szczury), na znaczeniu zyskują również badania z użyciem bezkręgowców (owady, dżdżownice, a także nicienie i pierwotniaki) oraz kręgowców zmiennocieplnych (ryby, płazy). Zwierzęta te są między innymi wykorzystywane do badań reakcji odpornościowych wywołanych zakażeniami bakteryjnymi, grzybiczymi i wirusowymi, w tym do badań przebiegu procesu zapalnego. Tematem niniejszej pracy będzie opisanie wkładu kilku gatunków bezkręgowców i kręgowców zmiennocieplnych w identyfikację cząsteczek związanych z odpowiedzią na zakażenie. Badania tego typu, przynajmniej na razie, nie wywołują ostrego sprzeciwu ze strony obrońców praw zwierząt, a dodatkowo pozwalają na odkrywanie ważnych procesów ewolucji odporności.

REAKCJA ZAPALNA

Zakażenie lub uszkodzenie tkanek wywołuje reakcję zapalną. Na pierwszym etapie dojść musi do rozpoznania elementów charakterystycznych dla patogenu, tzw. wzor-

ców molekularnych związanych z patogenem (ang. pathogen associated molecular patterns, PAMPs) lub uszkodzeniem tkanek (ang. damage associated molecular pattern molecu-



Ryc. 1. Uproszczony schemat transdukcji sygnału przez białko TOL-1 nicienia *Caenorabditis elegans*, Toll muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) i TLR kręgowców (wg KURZA i EWBANKA 2003, LEULIER i LEMAITRE 2008, zmodyfikowana).

Aktywacja receptorów Toll i TLR przez odpowiednio białko spatzie lub wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen associated molecular pattern, PAMP) powoduje zaangażowanie białka adaptorowego MyD88 (ang. myeloid differentiation primary-response protein 88) i kinazy IRAK (ang. IL-1R-associated kinases). Następnie dochodzi do aktywacji białka TRAF6 (ang. TNFR-associated factor 6). U muszki owocowej odpowiedniki tych białek stanowią Tube i Pelle. U kręgowców czynniki te aktywują TAK1 (ang. TGFβ-activated kinase 1), natomiast do tej pory nie poznano odpowiednika tej kinazy u muszki owocowej. TAK1 aktywuje kompleks degradujący IκB (ang. inhibitor of nuclear factor-κB). Odpowiednikiem IκB u muszki jest czynnik Cactus. Następnie dochodzi do uwolnienia czynnika jądrowego NF-κB (ang. nuclear factor κB) u kręgowców lub Dorsal i DIF (ang. dorsal-related immunity factor) u muszki. Czynniki te po przedostaniu się do jądra komórkowego uruchamiają transkrypcję białek skierowanych przeciwko mikroorganizmom AMP (ang. antimicrobial peptides) i/lub cytokin prozapalnych. Do tej pory u nicienia *C.elegans* poznano tylko kilka czynników zaangażowanych w transdukcję sygnału z receptora TOL-1 i są to MOM (ang. more of MS); TRF będący homologiem białka TRAF i Tube, PIK-1 homolog białka Pelle i IKB-1 będący prawdopodobnie odpowiednikiem IκB kręgowców.

les, DAMP) przez odpowiednie receptory znajdujące się na leukocytach. Do PAMP zaliczamy między innymi lipopolisacharyd (LPS) będący składnikiem ściany komórkowej bak-

terii Gram-, dwuniciowe RNA wirusów (ang. double stranded RNA, dsRNA) czy mannany budujące ścianę komórkową drożdży (GOŁĄB i współaut. 2009). Struktury te rozpoznawa-

ne są przez receptory PRR (ang. pathogen recognition receptors). Jednymi z lepiej poznanych receptorów PRR są receptory TLR (ang. Toll-like receptors). W tej chwili znanych jest 10 tego typu receptorów człowieka i 13 myszy. Spośród nich do najlepiej scharakteryzowanych należą TLR4, rozpoznający LPS, i TLR3, wiążący dsRNA (GOŁĄB i współaut. 2009). U zwierząt kręgowych TLR po połączeniu z odpowiednimi strukturami PAMP aktywują procesy odpornościowe między innymi przez pobudzenie syntezy cytokin prozapalnych (np. IL-1, TNF- α) (Ryc. 1, prawy panel) oraz zwiększenie ekspresji antygenów zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC) (BEULTER 2002).

Pobudzone leukocyty tkankowe w pierwszej kolejności produkują czynniki wazoaktywne (czynniki aktywne naczyniowo), które oddziałując na śródbłonek lokalnych naczyń krwionośnych powodują zmiany ich przepuszczalności, a w konsekwencji wysięk białek osocza do ogniska zapalenia. Z kolei wydzielane w miejscu zapalenia chemokiny (np. IL-8) i cytokiny prozapalne aktywują leukocy-

ty krwi i pobudzają ich migrację w kierunku tkanek objętych procesem zapalnym. U kręgowców pierwszymi leukocytami napływającymi do ogniska zapalenia są granulocyty obojętnochłonne (neutrofile), w drugiej fali pojawiają się tutaj monocyty/makrofagi (KOŁACZKOWSKA 2007). Fagocyty, które dotarły do miejsca zakażenia, pochłaniają (fagocytują) patogen, a następnie zajmują się jego eliminacją poprzez aktywację tlenowych (produkcja toksycznych rodników tlenowych) i beztlenowych (bakteriobójcze białka enzymatyczne np. lizozym i nieenzymatyczne np. laktoferyna) mechanizmów zabijania (MAJNO i JORIS 2004). Po usunięciu czynnika zapalnego dochodzi do wyciszenia reakcji zapalnej, a w procesie tym uczestniczą między innymi cytokiny przeciwzapalne (np. IL-10, TGF- α). Neutrofile, które zakończyły już swoje zadanie w ognisku zapalnym giną śmiercią apoptotyczną, natomiast komórki prezentujące antygen (ang. antigen presenting cells, APC), np. makrofagi, zdolne są do prezentacji antygenów limfocytom i inicjowania odpowiedzi nabytej (GOŁĄB i współaut. 2009).

NICIEŃ (*CAENORHABDITIS ELEGANS*)

Caenorhabditis elegans to wolno-żyjący niciel, który w środowisku naturalnym zamieszkuje gleby klimatu umiarkowanego. Formą dominującą u tego gatunku są osobniki hermafrodytyczne (obojnaczy), chociaż w populacji występują także osobniki męskie (0,2% całej populacji). Hermafrodytyczne osobniki *C. elegans* mogą wymieniać materiał genetyczny między sobą, bądź ulegać samozapłodnieniu. Samozapłodnienie form hermafrodytycznych umożliwia uzyskanie homozygotycznych linii nicienia. Co ciekawe, nicienie można zamrażać, a po odmrożeniu zachowują one żywotność i są zdolne do dalszego rozmnażania. Ta wysoka przeżywalność w niskich temperaturach umożliwia długoterminowe przechowywanie poszczególnych linii nicienia. Warto również zaznaczyć, że *C. elegans* był pierwszym organizmem wielokomórkowym, którego genom został w całości zsekwencjonowany (STERNBERG 2001).

C. elegans stał się słynny dzięki prowadzonym przez Brennera, Horvitz i Sulstona badaniom procesu apoptozy, które w 2002 r. zostały uhonorowane Nagrodą Nobla. Gatunek ten od wielu lat wykorzystywany jest w badaniach embriogenezy, morfogenezy, starzenia się oraz zaburzeń funkcjonowania

neuronów, a także służy do testowania leków przeciwbólowych i leków przeciw chorobie Alzheimera.

W ostatnim okresie rośnie liczba doświadczeń wykorzystujących *C. elegans* w badaniach reakcji odpornościowych. W związku z tym, że jego głównym pożywieniem są bakterie z gatunku *Escherichia coli*, w warunkach laboratoryjnych *C. elegans* hodowany jest na szalkach Petriego zawierających właśnie te bakterie. Daje to łatwą możliwość wprowadzania patogenów do organizmu. Pozwala także na wyciszanie genów nicienia przy wykorzystaniu RNAi (ang. RNA interference). W tym ostatnim przypadku wykorzystuje się *E. coli* z wprowadzonym dwuniciowym RNA (dsRNA), o budowie i sekwencji zbliżonej do sekwencji DNA genu, który planuje się wyłączyć. Po spożyciu tak zmodyfikowanych bakterii dsRNA dostaje się do organizmu nicienia i łącząc z odpowiadającą mu sekwencją mRNA gospodarza powoduje jego degradację i/lub blokadę translacji (GRAVATO-NOBRE i HODGKIN 2005). Równie łatwe jest tworzenie transgeniczných osobników poprzez mikroiniekcję lub „bombardowanie” DNA. Oczywiście *C. elegans* posiada też inne zalety. Hodowla nicienia jest tania, prosta i zajmuje mało miej-

sca. *C. elegans* ma krótki cykl życiowy (3 dni w 25°C), a osobniki dorosłe są małe (1 mm długości) i przezroczyste, co umożliwia obserwację procesów rozwojowych, czy przebiegu infekcji w czasie rzeczywistym (ang. real-time visualization). To ostatnie stało się szczególnie proste przy użyciu transgenicznych linii nicienia z białkami wyznakowanymi białkiem reporterowym GFP (zielone białko fluorescencyjne, ang. green fluorescent protein) lub przy użyciu wyznakowanych tym białkiem bakterii. Świecące intensywnie na zielono pod wpływem ultrafioletu białko GFP używane jest do znakowania innych białek. W uproszczeniu wygląda to tak, że po wstawieniu genu GFP do genomu jakiegoś innego organizmu gen ten łączy się z promotorem genu kodującego inne interesujące badacza białko. W efekcie białko to zostaje naznaczone przez GFP, co pozwala na obserwację jego umiejscowienia i przemieszczania się, a także na znakowanie całych komórek, jeśli gen białka GFP zostanie włączony do promotora genu kodującego białko charakterystyczne dla danego typu komórek.

W przypadku *C. elegans* metoda ta używana jest najczęściej do pomiaru namnażania i akumulacji patogenów w jelicie. Obserwuje się ponadto przeżywalność robaków po zakażeniu, ich zmiany morfologiczne i behawioralne oraz monitoruje zmiany w ekspresji genów przy użyciu ilościowego RT-PCR (ang. quantitative reverse transcription PCR) lub mikromacierzy (ang. microarray).

Od 1999 r., kiedy *C. elegans* został po raz pierwszy użyty w badaniach reakcji odpornościowych wywołanych infekcją (TAN i AUSUBEL 2000), lista gatunków/szczepów bakterii i grzybów, którymi zakażony jest nicienieć bardzo się wydłużyła. Część z nich, jak np. *Pseudomonas aeruginosa*, typowy mikroorganizm glebowy, z którym *C. elegans* może mieć kontakt w środowisku naturalnym, zwalczane są przy wykorzystaniu powszechnie występujących czynników bakteriobójczych, inne, jak *Bacillus thuringiensis* czy *Micobacterium nematophilum*, mogą wywoływać reakcje bardziej specyficzne (SCHULENBURG i współaut. 2004)

Bardzo ciekawym zjawiskiem jest odkryta u *C. elegans* behawioralna odpowiedź na patogen. Okazało się, że robak ten posiada skomplikowany system nawigacyjny, który pobudza jego chemotaksję w kierunku pokarmu (niepatogennych bakterii), czy partnera seksualnego, a pozwala unikać patogenów. Jak się okazuje ważnym elementem tego sy-

temu jest receptor Toll podobny do opisywanych wcześniej receptorów TLR (PUJOL i współaut. 2001). *C. elegans* ma 1 gen Toll – *tol-1*. Receptor TOL-1 (Ryc. 1, lewy panel) jest zaangażowany w rozwój nicienia, ale także w rozpoznanie patogenów. Okazuje się, że mutacja związana ze zmianami w cytoplazmatycznej domenie tego receptora powoduje zanik zdolności do unikania patogennego szczepu Db11 bakterii *Serratia marcescens*. Innym dowodem wskazującym na udział układu nerwowego nicienia w odporności przeciwko patogenom jest odkrycie, że mutacja unieczynnająca gen *daf-2*, związany z odpowiedzią na stres, wpływa również na odporność robaka na zakażenia bakteriami Gram+ i Gram- (GRAVATO-NOBRE i HODGKIN 2005). Wydaje się, że ta prosta zdolność *C. elegans* do unikania szczególnie patogennych szczepów bakterii może być w przyszłości jeszcze szerzej używana w badaniach wirulencji/zjadliwości patogenów, czyli ich zdolności do wniknięcia, namnożenia się i uszkodzenia tkanek zainfekowanego organizmu.

W przypadku, gdy nicienieć ulega zakażeniu, ma miejsce intensywna produkcja czynników niszczących lub hamujących wzrost patogenów. Do czynników tych należą lizozym, lipaza, a także caenopory (ang. caenopores), podobne do odkrytych wcześniej u pierwotniaków amebapory (ang. amoebapores) i proteiny podobne do saporozyn (GRAVATO-NOBRE i HODGKIN 2005). Amebapory są enzymami degradującymi lipidy i formującymi pory w błonie komórkowej patogenu, a ich przeciwbakteryjna rola została odkryta również u ssaków. Badania z wykorzystaniem mikromacierzy pozwoliły również na odkrycie co najmniej 6 różnych dróg transdukcji sygnału, które wydają się być aktywowane po zakażeniu i prowadzą do produkcji wspomnianych czynników antybakteryjnych. Są to: (i) droga związana z aktywacją czynnika podobnego do TGF- (ang. *transformin growth factor-like pathway*), (ii) droga związana z aktywacją czynnika podobnego do receptora insuliny (ang. *insulin-receptor-like pathway*), (iii) droga związana z programowaną śmiercią komórki (ang. *programmed cell death*, PCD) i w końcu trzy drogi związane z kinazami MAP (p38, c-Jun i ERK). Bardzo ciekawy jest fakt, że do aktywacji większości z tych szlaków dochodzi również w odpowiedzi na stres i podczas rozwoju *C. elegans* (TAN i AUSUBEL 2000).

Warto zaznaczyć, że *C. elegans* nie jest jednak idealnym gatunkiem do badań re-

akcji odpornościowych. Podobnie jak inne zwierzęta bezkręgowce, nie posiada bowiem odporności nabytej i, co charakterystyczne tylko dla nicienia, nie ma wcale lub prawie wcale fagocytów będących odpowiednikiem makrofagów i neutrofilii (GRAVATO-NOBRE i HODGKIN 2005). Wydaje się, że głównymi komórkami odpowiadającymi na zakażenie są u niego komórki nabłonkowe, które spełniają

rolę podobną do tej, jaką u kręgowców spełnia tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi (ang. mucosa-associated lymphatic tissue, MALT). Ponadto, nie udało się do tej pory próby użycia *C. elegans* w badaniach zakażeń wirusowych, bakteriami wewnątrzkomórkowymi oraz wielokomórkowymi pasożytami (GRAVATO-NOBRE i HODGKIN 2005).

MUSZKA OWOCOWA (*DROSOPHILA MELANOGASTER*)

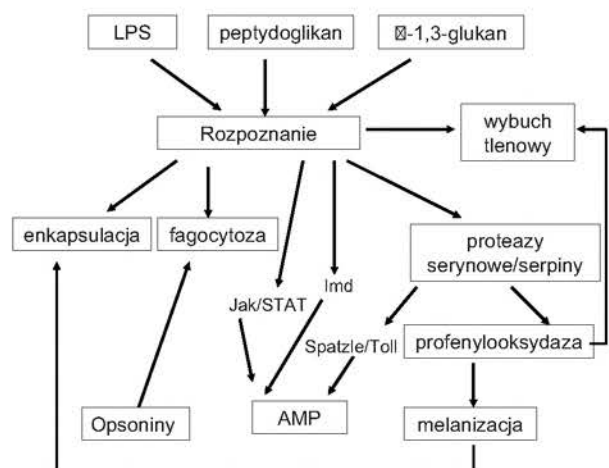
Spośród zwierząt bezkręgowych najbardziej popularnym obiektem badawczym jest muszka owocowa (wywilżnia karłowka, *Drosophila melanogaster*). Jest niewielkim owadem mierzącym 2–3 mm, należącym do rzędu muchówek. Dzięki łatwej hodowli i prostemu sposobowi krzyżowania (zdolne do rozmnażania po 2–3 tygodniach) muszki owocowe są powszechnie stosowane w badaniach genetycznych. Genom muszki owocowej został w całości zsekwencjonowany i opublikowany w 2000 r. na łamach *Nature* (ADAMS 2000).

Drosophila melanogaster jest używana w badaniach kilku chorób neurodegeneracyjnych takich jak: choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, ataksja czy też w chorobie Alzheimer. Naukowcy stworzyli transgeniczne linie *Drosophila*, z nadekspresją zmutowanych białek, które powodują neurodegenerację. Co szczególnie ważne w kontekście niniejszej pracy muszka owocowa wykorzystywana jest również do badań nad odpornością wrodzoną. Pierwszą linią obrony owada przed zakażeniem jest zewnętrzna kutikula i chitynowe membrany wyścielające jelito i tchawki (główna droga infekcji). Dodatkową ochronę przed zasiedleniem jelita przez patogeny stanowi niskie pH i wydzielanie czynników bakteriobójczych takich, jak np. lizozym. W przeciwieństwie do opisanego powyżej *C. elegans*, muszka owocowa posiada kilka tysięcy wyspecjalizowanych komórek immunokompetentnych – hemocytów, zdolnych m.in. do fagocytozy. Hemocyty, na podstawie ich funkcji i morfologii, podzielić można na 4 główne grupy: komórki wydzielnicze, fagocytujące plazmatocyty (najlicniejsza populacja), lamellocyty zaangażowane w procesie enkapsulacji (otaczania) pasożytów i tzw. komórki krystaliczne biorące udział w procesie melanizacji – konwersji dopaminy w toksyczną dla patogenów melaninę (LANOT i współaut. 2001). Badania hemato-

pozy muszki owocowej wykazały udział w tym procesie 3 genów: *serpent*, *lozenge* i *U-shape*, podobnych w budowie i funkcji do genów *GATA*, *AML1* (ang. acute myeloid leukemia-1), *FOG* (ang. friend of GATA), zaangażowanych w hematopoezę ssaków (LANOT i współaut. 2001). Warto również wspomnieć, że wyprowadzono kilka linii komórkowych, pozwalających na efektywne badania odporności muszki w warunkach *in vitro*. Przykładowo linie plazmocytów S2, KC, BG2-C6 i Shi używane są szeroko do badania procesu fagocytozy oraz mechanizmów obrony przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym, np. *Mycobacterium fortuitum* oraz grzybom. W ostatnich latach badania te znacznie wzbogaciło użycie wspomnianych już RNAi, powodujących wyciszenie rozmaitych genów związanych z odpornością (LEVITIN i WHITEWAY 2008).

Rozpoznanie patogenu pobudza również gwałtowną kaskadę czynników proteolitycznych oraz produkcję w ciele tłuszczowym dodatkowych białek skierowanych przeciwko mikroorganizmom (ang. antimicrobial peptides, AMP), białek odpowiedzi na stres, czy cząsteczek ograniczających dostępność żelaza (TZOU i współaut. 2002) (Ryc. 2). Spośród AMP wyróżnia się przeciwgrzybiczne drozomycyny i miecznikowiny, skierowane przeciwko bakteriom Gram-: atacyny, cekropiny, dipterycyny i drozocyny, oraz defensyny atakujące bakterie Gram+. Stwierdzono, że spośród 13600 genów *Drosophila* ekspresja kilkuset ulega zmianie podczas zakażenia (TZOU i współaut. 2002).

Badania *D. melanogaster* zaowocowały lepszym poznaniem procesu rozpoznawania wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP) przez receptory TLR. Receptory Toll zostały po raz pierwszy opisane właśnie u muszki owocowej, jako jeden z czynników warunkujących prawidłowe różnicowanie grzbieto-brzusze, a następnie oka-



Ryc. 2. Mechanizmy odpornościowe uruchamiane po rozpoznaniu patogenu w organizmie muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) (wg TZOU i współaut. 2002, zmodyfikowana).

Wzorce molekularne, takie jak np. lipopolisacharyd (LPS) czy peptydoglikan, są rozpoznawane przez hemocyty, które zdolne są do fagocytozy, enkapsulacji oraz produkcji wolnych rodników. Układ profenylooksydazy bierze udział w procesie melanizacji, czyli konwersji dopaminy w toksyczną dla patogenów melaninę. Po aktywacji szlaku związanego z białkiem Toll (rozpoznanie grzybów i bakterii Gram+), białkiem Imd (ang. immune deficiency) po rozpoznaniu bakterii Gram- lub uruchomieniu kaskady sygnałowej Jak/STAT (ang. Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) dochodzi do produkcji peptydów skierowanych przeciwko mikroorganizmom (ang. antimicrobial peptides, AMP).

zało się, że te same receptory biorą udział w obronie przeciw grzybom i bakteriom Gram+ (WANG i LIGOXYGAKIS 2006). Późniejsze bada-

nia pozwoliły odkryć u muszki jeszcze jedną, niezależną od receptorów Toll, drogę rozpoznawania patogenów – Imd (ang. immune deficiency pathway). Na drodze tej dochodzi do rozpoznania bakterii Gram-. Obie drogi wydają się przebiegać niezależnie i prowadzą do powstania innych AMP (TZOU i współaut. 2002, AKIRA i TAKEDA 2005). W przeciwieństwie do kręgowców, receptory Toll muszki nie rozpoznają struktur PAMP bezpośrednio. Sądzi się obecnie, że rozpoznanie patogenu uaktywnia zewnątrzkomórkową kaskadę proteolityczną w hemolimfie, co prowadzi do aktywacji białka Spatzle. Białko to po związaniu z receptorem Toll doprowadza do transdukcji sygnału i degradacji białka Cactus, homologicznego do I κ B, a to z kolei umożliwi translokację do jądra komórkowego czynników transkrypcyjnych Dorsal i Dif. Czynniki te inicjują powstawanie odpowiednich białek przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych (Ryc. 1, środkowy panel).

Muszka owocowa wykorzystywana jest do badania wirulencji zmutowanych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Innymi patogenami, które mogą być z sukcesem badane przy użyciu *Drosophila*, są ludzkie pasożyty, w których przeniesieniu pośredniczą owady, np. wywołujące malarię zarodźce z rodzaju *Plasmodium* (TZOU i współaut. 2002).

D. melanogaster okazała się też być znakomitym modelem do badań infekcji grzybiczych. Nakłucie ciała owada igłą pokrytą takimi znanymi z zakażeń u człowieka grzybami, jak *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* czy *Aspergillus neoformans*, wykazało, że patogeny te mogą być letalne dla owadów, a nasilenie śmiertelności zmienia się u muszek z mutacjami w obrębie genów szlaku Toll (LEVITIN i WHITEWAY 2008).

DANIO PRĘGOWANE (*DANIO RERIO*)

Danio pręgowane (*Danio rerio*) należy do ryb doskonałokostnych (Teleostei) i, wraz z karpem królewskim i karasiem srebrzystym, zalicza się go do rodziny karpowatych (Cyprinidae). Danio zamieszkuje naturalne zbiorniki wodne Indii, Pakistanu i Butanu, ale od lat jest również jedną z najczęściej hodowanych ryb akwariowych. Danio to smułka mała rybka, posiadająca wzdłuż grzbietu pięć równoległych, niebieskich pasków. Osiąga długość ok. 4 cm, jest łatwa w hodowli (jedna samica jest w stanie złożyć około 200

jaj na tydzień). *Danio rerio* jest obiektem badawczym w projekcie sekwencjonowania genomu (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio), a wstępne wyniki wydają się potwierdzać, że genom danio zawiera wiele genów homologicznych (ortologicznych) w stosunku do genomu ssaków (BARBAZUK i współaut. 2000).

Już od ponad 30 lat danio wykorzystywany jest w badaniach ontogenetycznych. Zarodki oraz larwy w ciągu pierwszych kilku dni rozwoju są przezroczyste, co ułatwia ich

badania i manipulacje. Danio jest również zwierzęciem, u którego w sposób stosunkowo prosty dokonać można modyfikacji genetycznych. Jedną z metod modyfikacji genetycznych używanych dla tego gatunku jest technika z użyciem zmodyfikowanych antysensownych oligonukleotydów (morpholino). Wstrzyknięcie do zarodków specyficznych dla danego genu morpholino powoduje przejściowe (do 5 dni) wyciszenie funkcji danego genu poprzez zahamowanie splicingu (składanie genu) lub translacji mRNA (NASEVICIUS i EKKER 2000).

W przeciwieństwie do opisanych poprzednio zwierząt bezkręgowych, ryby doskonałokostne posiadają w pełni rozwinięty układ odpornościowy, składający się zarówno z odporności wrodzonej, w której zaangażowane są głównie fagocyty, jak i odporności nabytej, w której biorą udział limfocyty. Niewątpliwą zaletą danio, wykorzystywaną w badaniach reakcji odpornościowych jest fakt, że poznano już punkty czasowe w rozwoju osobniczym, na jakich pojawiają się poszczególne typy leukocytów. I tak, makrofagi pojawiają się około 25 godziny po zapłodnieniu (ang. hours post-fertilization, hpf), neutrofile w 48 hpf, natomiast dopiero w 4 dniu po zapłodnieniu dochodzi do ekspresji genów *rag-1* i *rag-2*, związanych z rozwojem limfocytów. Zaznaczyć jednak trzeba, że odporność nabyta rozwija się u danio przez kolejne 4-6 tygodni, a pierwsze wyprodukowane przeciwciała są wykrywane w 4 tygodnie po zapłodnieniu (VAN DER SAR i współaut. 2004).

Ze względu na swoje niewielkie rozmiary i przejrzystość ciała możliwe stało się obserwowanie przebiegu reakcji odpornościowych danio w czasie rzeczywistym, tak jak to opisano powyżej dla *C. elegans*. W tym celu wygenerowano szereg transgenicznych linii rybki z wyznakowanymi fluorescencyjnie specyficznymi populacjami leukocytów, np. GATA-1^{eGFP} to ryby z wybarwionymi białkiem GFP komórkami linii erytroidalnej, a u ryb linii *rag1*^{eGFP} i *rag2*^{eGFP} „świecą” niedojrzałe limfocyty (VAN DER SAR i współaut. 2004, SULLIVAN i KIM 2008).

Danio i ssaki mogą być zakażane przez podobne patogeny. Przykładowo, danio jest wrażliwe na zakażenia typowych dla ssaków patogenów, takich jak *Listeria monocytogenes* czy *Streptococcus pyogenes*, może również być zakażany patogenami typowymi dla ryb, ale blisko spokrewnionymi z patogenami ssaków. Na przykład danio zakaża się

bakterią *Mycobacterium marinum*, blisko spokrewnioną z wywołującą gruźlicę *Mycobacterium tuberculosis*. Zgodnie z oczekiwaniami, *M. marinum* jest w stanie przetrwać i powielać się u dorosłych danio, co prowadzi do rozwoju ostrej lub przewlekłej choroby, w zależności od drogi podania patogenu (SULLIVAN i KIM 2008). W tym miejscu warto wspomnieć, że w naturalnych warunkach patogeny zakażają danio poprzez przewód pokarmowy, skrzelą lub zranienia na powierzchni skóry. Dodatkowo źródłem zakażeń mogą być także pijawki i inne pasożyty ssące krew. W przypadku zakażeń eksperymentalnych główną drogą podania patogenu pozostaje jednak dootrzewnowa iniekcja lub zanurzenie (imersja) w kąpielii wodnej, zawierającej badany patogen, przy czym jedynie ta pierwsza droga podania pozwala na pełną kontrolę dawki podanego patogenu (VAN DER SAR i współaut. 2004).

W badaniach z użyciem *M. marinum*, wybarwione fluorescencyjnie bakterie podawane są przezroczystym zarodkom (32 hpf), a rozwój odpowiedzi może być śledzony w czasie rzeczywistym (VAN DER SAR i współaut. 2004). Eksperymenty te pozwoliły między innymi zaobserwować tworzenie się wokół bakterii, charakterystycznych dla gruźlicy, wielojądrowych komórek olbrzymich (ang. giant cells), powstałych z połączenia makrofagów i tzw. ziarniniaków, czyli zgrupowań makrofagów oraz innych leukocytów wraz z elementami macierzy pozakomórkowej. Struktury te mają za zadanie otoczenie patogenów lub ciał obcych, których nie udało się wyeliminować na drodze fagocytozy (MAJNO i JORIS 2004). Wiele wyników uzyskanych podczas badań nad danio z pewnością będzie przydatnych w badaniach nad ludzką gruźlicą (VAN DER SAR i współaut. 2004, SULLIVAN i KIM 2008).

Z kolei w doświadczeniach przeprowadzanych przez MENUDIER'A i współpracowników (1996) ryby zakażane były różnymi gatunkami *Listeria*. W przeciwieństwie do myszy, danio okazały się znacznie mniej wrażliwe na te zakażenia, a dawka patogenu powodująca śmierć zwierząt była u nich wielokrotnie wyższa. A zatem zidentyfikowanie czynników odpowiedzialnych za to zjawisko być może będzie pomocne w leczeniu listerioz ssaków (SULLIVAN i KIM 2008).

Danio jest również używane w badaniach zakażeń wirusowych. Podobnie, jak to miało miejsce w przypadku patogenów bakteryjnych, również w przypadku zakażeń wiruso-

wych stosuje się dwa podejścia: ryby zakaża się wirusami charakterystycznymi dla ryb karpiovatych albo patogenami charakterystycznymi dla ssaków. W obydwu wypadkach wiąże się to z trudnościami w dopasowaniu temperatury hodowli ryb do takiego poziomu, by był on równocześnie optymalny dla rozwoju infekcji (YODER i współaut. 2002).

Wykazano, że danio jest wrażliwe na zakażenia wirusem IHNV (ang. infectious hematopoietic necrosis virus), SVCV (ang. spring viremia of carp virus); w obydwu wypadkach rozwój choroby następuje tylko u osobników dorosłych (SULLIVAN i KIM 2008). Wirus wiosennej wiremii (SVCV) występuje zazwyczaj u karpia, a jego ogniska zwykle pojawiają się zimą lub wczesną wiosną, ponieważ niższa temperatura wpływa hamująco na aktywność systemu odpornościowego ryb. Zgodnie z oczekiwaniami, również u danio wyniki zakażenia zależą od temperatury, choć różnice między poszczególnymi temperaturami są mniej wyraźne niż u karpia. Stwierdzono, że wirus wiosennej wiremii powoduje u danio uszkodzenie tkanek i narządów wewnętrznych, krwawe wybroczyny i stany zapalne.

Z kolei badania z użyciem rhabdowirusa SHRV (ang. snakehead rhabdovirus) wykazały, że zakażenie zarodków (24 hpf) poprzez imersję powoduje około 55% śmiertelność, podczas gdy dootrzewnowe podanie tego wirusa osobnikom dorosłym powoduje śmiertelność sięgającą 70%. Przy czym zarówno w przypadku zarodków, jak i dorosłych osobników zakażenie SHRV powodowało podniesienie ekspresji czynników antywirusowych, takich jak interferon (IFN) i białko Mx. Ciekawe wydaje się odnalezienie czynników, które wpływają na zmniejszenie śmiertelności młodych osobników (VAN DER SAR i współaut. 2004, SULLIVAN i KIM 2008).

Jak już wspomniano, podstawową zaletę badań danio stanowi możliwość analizy reakcji odpornościowych w czasie rzeczywistym, dzięki zastosowaniu znakowania komórek patogenów lub leukocytów ryb białkami fluorescencyjnymi, np. GFP. Zaznaczyć jednak trzeba, że do tego typu analizy mogą być jedynie wykorzystywane osobniki przezroczyste (w przypadku danio do 8 dnia po zapłodnieniu), co oznacza niemożność przeprowadzania takich badań w przypadku dojrzałych osobników. W tym kontekście nie można zapominać o istniejących zarówno u ryb, jak i u ssaków różnicach w odpowiedzi immunologicznej osobników młodych i dorosłych i o bardzo istotnym zjawisku dojrzewania odpor-

ności (GOŁĄB i współaut. 2004). Naukowcy mają jednak nadzieję, że w najbliższej przyszłości możliwe będzie wyprowadzenie linii danio, które pozostawać będą przejrzyste nawet w późniejszych stadiach życia, tak jak udało się to osiągnąć dla innej rybki akwariowej – ryżówki japońskiej (*Oryzias latipes*) (WAKAMATSU i współaut. 2001).

Niewątpliwą niedogodnością w studio-waniu układu odpornościowego danio pozostaje nadal prawie zupełny brak narzędzi do badań na poziomie identyfikacji jego białek, przede wszystkim przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko markerom komórkowym i cytokinom. Dostępne na rynku przeciwciała swoiste wobec białek ssaków najczęściej nie wiążą się specyficznie z odpowiednimi białkami danio. Problem ten obecnie rozwiązuje się badając odporność ryb na poziomie molekularnym głównie przez sekwencjonowanie genów kodujących białka biorące udział w reakcjach odpornościowych i badanie ekspresji ich mRNA. Bardzo pomocny w tych poczynaniach jest oczywiście projekt sekwencjonowania całego genomu danio przegowanego, prowadzony przez firmę Sanger. Nie można jednak w tym kontekście zapominać, że duplikacja genów i dystans filogenetyczny pomiędzy rybami a ssakami powodują znaczne trudności w interpretacji czy dane geny są rzeczywistymi ortologami – genami homologicznymi o takiej samej lub zbliżonej funkcji. Wydaje się, że w przyszłości w rozważaniach tych nieco pomoże analiza syntenii genów, czyli ich występowania w określonym porządku u różnych gatunków.

Immunologom badającym odporność ryb, a w szczególności ryb karpiovatych, ciągle doskwiera również brak specyficznych linii komórkowych umożliwiających badania poszczególnych populacji leukocytów. W przypadku danio jest to szczególnie uciążliwe, ponieważ małe rozmiary zwierząt nie pozwalają na wyizolowanie dostatecznej liczby komórek, niezbędnej do przeprowadzenia wiarygodnych testów *in vitro*. Wiele laboratoriów rozwiązuje ten problem wykorzystując w badaniach narządy i komórki pobrane od karpia (*Cyprinus carpio* L.), który jest gatunkiem blisko spokrewnionym z danio.

Pomimo iż model infekcyjny z użyciem danio jest stosunkowo nowy, udało się przeprowadzić doświadczenia z kilkoma patogenami, zarówno wirusowymi, jak i bakteryjnymi. Jak już wspomniano, problemem z wykorzystaniem w tych badaniach patogenów ssaków może być temperatura przetrzymywania

ryb, która najczęściej nie jest temperaturą optymalną do rozwoju patogenu. Trzeba tu przypomnieć, że danio są zazwyczaj hodowane w temperaturze 26–28°C, a w wyższej temperaturze wykazują zwiększoną śmiertelność, natomiast temperatura optymalna dla

rozwoju ssaczych patogenów to około 37°C. Dlatego coraz częściej w tego typu badaniach wykorzystuje się patogeny ryb blisko spokrewnione z chorobotwórczymi patogenami ssaków lub patogeny o zmodyfikowanych preferencjach termicznych.

ŻABA SZPONIASTA (*XENOPUS LAEVIS*)

Żaba szponiasta (Platana szponiasta, *Xenopus laevis*) jest płazem bezogonowym z rodziny grzbietorodowatych (Pipidae). Prowadzi wodny tryb życia, należy do gatunków synantropijnych, może przetrwać porę suchą w wilgotnym mule na dnie zbiorników wodnych. Osiąga długość od 8 cm (samce) do 15 cm (samice). Kilka razy w roku samica składa jaja, których liczba dochodzi do 15000 sztuk. Jaja mają wielkość ok. 3 mm. Kijanki wylęgają się z jaj po 48 godzinach. Przeobrażenie trwa od 15 do 20 dni. *Xenopus laevis* potrzebuje od 1–2 lat, aby osiągnąć dojrzałość płciową. Żaby te są łatwe w hodowli, posiadają duże komórki jajowe, a ich kijanki są przezroczyste. Wszystko to sprawia, że łatwo i dokładnie można śledzić poszczególne etapy rozwoju zarodka.

Co ciekawe, już na początku XX w. samice tych żab były używane w naturalnych testach ciążowych. Okazało się bowiem, że są niezwykle wrażliwe na ludzki hormon ciążowy – gonadotropinę kosmówkową, i wstrzyknięcie młodym samicom moczu ciężarnych kobiet powodowało u nich silną owulację.

W kontekście niniejszej pracy, szczególnie ważny jest fakt użycia tego gatunku w badaniach filogenezy i ontogenezy odporności wrodzonej i nabytej. Jest to możliwe między innymi dzięki możliwości manipulowania układem odpornościowym na wczesnych stadiach rozwojowych, co związane jest zarówno z pozaustrojowym rozwojem tego płaza, jak i faktem, że kijanki *X. laevis* są przezroczyste. Manipulacje, takie jak wczesna tymektomia (grasicę usuwa się w odpowiednich stadiach larwalnych chirurgicznie, bądź poprzez naświetlanie promieniami gamma), pozwoliły między innymi na stwierdzenie kluczowej roli limfocytów T w odpowiedzi przeciwnowotworowej, a także w odrzucaniu przeszczepów skórnych (np. HORTON i współaut. 1998). Jednymi z najbardziej wartościowych instrumentów w badaniach dotyczących odporności płatany, szczególnie badań białek głównego układu zgodności

tkankowej (MHC), było stworzenie wsobnych szczepów zwierząt, takich jak: szczep F (f/f MHC haplotyp) (DU PASQUIER i współaut. 1975) i J (j/j MHC haplotyp) (TOCHINAI i KATAGRI 1975), a także zdefiniowanych syngenicznych klonów żab. Te ostatnie stworzono dzięki gynogenetycznej krzyżówce międzygatunkowej pomiędzy *X. laevis* i *X. gilli* (DU PASQUIER i współaut. 1975). Zarówno *X. laevis*, jak i spokrewniony z nim gatunek żaby *Sturana (Xenopus) tropicalis*, potocznie zwany zachodnią żabą szponiastą, są w ostatnich latach wykorzystywane w badaniach reakcji odpornościowych (MORALES i ROBERT 2008), w szczególności do testowania odpowiedzi przeciwko grzybowi *Batrachochytrium dendrobatidis* i ranawirusowi. W tym miejscu warto zauważyć, że obydwa te patogeny odpowiedzialne są prawdopodobnie za obserwowany w ciągu ostatniej dekady, spadek liczebności światowej populacji wolno-żyjących płazów. A zatem badania przeprowadzane na płataniu przyczynić się mogą do zahamowania tego procesu. Stwierdzono między innymi, że wiele antybakteryjnych peptydów pochodzących ze skóry *X. laevis* hamuje wzrost *B. dendrobatidis* (ROLLINS-SMITH i COLON 2005) i namnażanie wirusów (CHINCHAR i współaut. 2004). Co ciekawe, aktywacja osi stresu (ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) u płazów powoduje uwalnianie tych właśnie peptydów. Badania prowadzone na płazach mogą również pomóc w wyjaśnieniu pewnych mechanizmów związanych z komunikacją układów odpornościowego i neuroendokrynnego.

Nowe możliwości w badaniach odporności płatany przyniósł projekt sekwencjonowania genomu *Xenopus*. Badania te prowadzone są na *X. tropicalis*, a nie *X. laevis*. Zadecydowały o tym względy praktyczne, *X. tropicalis* jest bowiem zdecydowanie mniejsza od żaby szponiastej (wymaga więc mniejszej przestrzeni hodowlanej), a zdolna do rozrodu staje się już po 4 miesiącach. Ma też mniejszy genom – po dwie kopie każdego genu rozmieszczone na 10 parach chro-

mosomów, podczas gdy *X. laevis* może mieć nawet 4 kopie każdego genu rozmieszczone na 18 parach chromosomów (HELLSTEN i współaut. 2010). Z opublikowanych w kwietniu 2010 r. badań genomu *X. tropicalis* wynika, że prawie 80% (ok. 1,7 tys.) wszystkich ludzkich genów związanych z chorobami o podłożu genetycznym, ma swoje odpowiedniki u tego gatunku (HELLSTEN i współaut. 2010), co dowodzi, że zachodnia żaba szponiasta może posłużyć do badań wrodzonych schorzeń człowieka. Badania genomu *X. tropicalis* pozwoliły do tej pory na uzupełnienie naszej wiedzy na temat ścieżek aktywacji dopełniacza, cytokin prozapalnych i chemokin. Stwierdzono ponadto, że genom *X. tropicalis* zawiera co najmniej 75 genów kodujących

białka związane z receptorami dla fragmentu Fc przeciwciał. Funkcja wielu z tych genów jest obecnie nieznana, ale ich niezwykła różnorodność i ich podział na dwie grupy receptorów sygnalizacji, aktywatory i inhibitory, sugeruje, że biorą udział w regulacji funkcji układu odpornościowego (MORALES i ROBERT 2008).

Bardzo ważnym elementem projektu zespołu Hellstena było odkrycie i analiza tych regionów genomu, w których geny żaby ułożone są niemal w tym samym porządku, co u innych kręgowców w tym człowieka (syntenia). Zbadanie tych odcinków pomoże w lepszym zrozumieniu procesów ewolucji, w tym oczywiście również ewolucji odporności.

WNIOSKI KOŃCOWE

Dzięki rozwojowi nauk biologicznych, nowoczesnym technologiom oraz użyteczności takich zwierząt jak: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* czy *Danio rerio*, osiągnięto wysoki stopień zaawansowania badań w tym także nad układem odpornościowym. Przyczyniły się one do poszerzenia wiedzy na temat wielu skomplikowanych procesów metabolicznych, procesów związanych ze starzeniem się organizmów czy też identyfikacji czynników odpowiedzialnych za różne patologie m.in. przerzutowanie nowotworowe, odrzucanie przeszczepów, czy choroby autoimmunizacyjne. Nie można jednak zapominać, że badania na organizmach modelowych są tylko jednym ze szczebli badań i zanim konkretne

rozwiązania wprowadzone zostaną do badań klinicznych poprzedzone muszą być skrupulatnymi studiami na organizmach bliżej spokrewnionych z człowiekiem.

PODZIĘKOWANIA

Autorki dziękują bardzo Prof. dr hab. Barbarze Płytycz i Dr Elżbiecie Kołaczekowskiej z Zakładu Immunobiologii Ewolucyjnej Uniwersytetu Jagiellońskiego za cenne wskazówki. Niniejsza praca nie powstałaby również bez wsparcia programu FP7-People-ERG-2008 (228583 NEUROINF, FP7, Z/7PR/00015) i Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW, 999/7.PR UE/2009/7, K/PMW/000060).

INVERTEBRATES AND ECTOTHERMIC VERTEBRATES AS MODELS FOR INFECTION DISEASES AND IMMUNE REACTIONS

Summary

Ethical issues concerning application of mammalian species in experiments lead researchers to finding of alternative animal models such as invertebrates and ectothermic vertebrates. The most studied invertebrate models are fruit fly (*Drosophila melanogaster*) and nematode *Caenorhabditis elegans*. Studies of fruit fly helped to understand mechanisms of recognition of pathogen associated molecular patterns (PAMP) by pattern recognition receptors (PRR). Whereas *C. elegans* enlightened our knowledge about programmed cell death –

apoptosis. Recently, zebrafish (*Danio rerio*) and clawed frog (*Xenopus laevis*) are often used to study the immune system. Small size and transparency of *C. elegans* and larvae of zebrafish enable real-time analysis of their immune responses. All the mentioned species are now used to study immune reactions upon bacterial, fungal and viral infections. Development of new laboratory tools, including specific monoclonal antibodies, should facilitate identification of crucial, evolutionarily conserved mediators associated with these processes.

LITERATURA

- ADAMS M. D., 2000. *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science 5461, 2185-2195.
- AKIRA S., TAKEDA K., 2005. *Toll-like receptors in innate immunity*. Int. Immunol. 17, 1-14.
- BARBAZUK W. B., KORF I., KADAVI C., HEYEN J., TATE S., 2000. *The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes*. Genome Res. 10, 1351-1358.
- BEUTLER B., 2002. *TLR4 as the mammalian endotoxin sensor*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 270, 109-120.
- CHINCHAR V. G., BRYAN L., SILPHADAUNG U., NOGA E., WADE D., ROLLINS-SMITH L., 2004. *Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides*. Virology 323, 268-275.
- DU PASQUIER L., CHARDONNENS X., MIGGIANO V. C., 1975. *A major histocompatibility complex in the toad Xenopus laevis*. Immunogenetics 1, 482-494.
- GOŁĄB J., JAKÓBISIAK M., LASEK W., STOKŁOSA T., 2009. *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- GRAVATO-NOBRE M. J., HODGKIN J., 2005. *Caenorhabditis elegans as a model for innate immunity to pathogens*. Cell Microbiol. 7, 741-751.
- HELLSTEN U., RICHARD M., MICHAEL J., 2010. *The genome of the western clawed frog Xenopus tropicalis*. Science 328, 633-636.
- HORTON T. L., RITCHIE P., WATSON M. D., HORTON J. D., 1998. *Natural cytotoxicity towards allogeneic tumor targets in Xenopus mediated by diverse splenocyte populations*. Dev. Comp. Immunol. 22, 217-230.
- KOŁACZKOWSKA E., 2007. *Zapalenie (ostre) jako reakcja korzystna dla organizmu – historia badań a najnowsze osiągnięcia*. Kosmos 56, 27-38.
- KURZ C. L., EWBANK J. J., 2003. *Caenorhabditis elegans: an emerging genetic model for the study of innate immunity*. Nat. Rev. Genet. 4, 380-390.
- LANOT R., ZACHARY D., HOLDER F., MEISTER M., 2001. *Postembryonic hematopoiesis in Drosophila*. Dev. Biol. 230, 243-257.
- LEULIER F., LEMAITRE B., 2008. *Toll-like receptors-taking an evolutionary approach*. Nat. Rev. Genet. 9, 165-178.
- LEVITIN A., WHITEWAY M., 2008. *Drosophila innate immunity and response to fungal infections*. Cell Microbiol. 10, 1021-1026.
- MAJNO G., JORIS I., 2004. *Cells, tissues, and disease: principles of general pathology*. Oxford University Press, Oxford, Blackwell, USA.
- MENUDIER A., ROUGIER F. P., BOSGIRAUD C., 1996. *Comparative virulence between different strains of Listeria in zebrafish (Brachydanio rerio) and mice*. Path. Biol. 44, 783-789.
- MORALES H., ROBERT J., 2008. *In vivo and in vitro techniques for comparative study of antiviral T-cell responses in the amphibian Xenopus*. Biol. Proced. Online 10, 1-8.
- NASEVICIUS A., EKKER S. C., 2000. *Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish*. Nat. Genet. 26, 216-220.
- PUJOL N., LINK E. M., LIU L. X., KURZ C. L., ALLOING G., TAN M. W., RAY K. P., SOLARI R., JOHNSON C. D., EWBANK J. J., 2001. *A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in Caenorhabditis elegans*. Curr. Biol. 11, 809-821.
- ROLLINS-SMITH L. A., CONLON J. M., 2005. *Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations*. Dev. Comp. Immunol. 29, 589-598.
- SCHULENBURG H., KURZ C. L., EWBANK J. J., 2004. *Evolution of the innate immune system: the worm perspective*. Immunol. Rev. 198, 36-58.
- STERNBERG P. W., 2001. *Working in the post-genomic C. elegans world*. Cell 105, 173-176.
- SULLIVAN C., KIM C. H., 2008. *Zebrafish as a model for infectious disease and immune function*. Fish & Shellfish Immunol. 25, 341-350.
- TAN M. W., AUSUBEL F. M., 2000. *Caenorhabditis elegans: a model genetic host to study Pseudomonas aeruginosa pathogenesis*. Curr. Opin. Microbiol. 3, 29-34.
- TOCHINAI S., KATAGIRI C. H., 1975. *Complete abrogation of immune responses to skin allografts and rabbit erythrocytes in the early thymectomized Xenopus*. Dev. Growth Differ. 17, 283-294.
- TZOU P., DE GREGORIO E., LEMAITRE B., 2002. *How Drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions*. Curr. Opin. Microbiol. 5, 102-110.
- VAN DER SAR A. M., APPELMELK B. J., VANDENBROUCKE-GRAULS J. E., BITTER W., 2004. *A star with stripes: zebrafish as an infection model*. Trends Microbiol. 12, 451-457.
- WAKAMATSU Y., NIWA I., LADYGINA K., KINOSHITA T., ARAKI M., OZATO K., 2001. *Fertile and diploid nuclear transplantants derived from embryonic cells of a small laboratory fish medaka (Oryzias latipes)*. Prac. Natl. Acad. Sci. USA 98, 1071-1076.
- WANG L., LIGOXYGAKIS P., 2006. *Pathogen recognition and signalling in the Drosophila melanogaster innate immune response*. Immunology 211, 251-261.
- YODER J. A., NIELSEN M. E., AMEMIYA C. T., LITMAN G. W., 2002. *Zebrafish as an immunological model system*. Microbes Infect. 4, 1469-1478.