

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jan Vintř

Sdílené mechanismy vývoje tělních extremit u obratlovců
Shared mechanisms of development of vertebrate body appendages

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. Vladimíru Soukupovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při psaní této práce.

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, 8. 6. 2020

Podpis:

Abstrakt

Mezi tělní extremity obratlovců patří, mimo jiné, končetiny, párové a mediální ploutve, ocasní hrbol, kloakální oblast, vousky a deriváty faryngeálních oblouků. Tyto výběžky sdílejí navzdory funkčním a tvarovým rozdílům řadu vývojově-genetických mechanismů. Vývoj těchto struktur je regulován především signálními drahami Fgf, Shh, Wnt, Tgf- β a kyselinou retinovou, aktivitou transkripčních faktorů Hox a Tbx, přičemž mají významnou funkci *cis*-regulační elementy genů, kterými jsou tyto faktory kódovány. Jedním ze společných prvků struktur, kterých se týká tento text, je přechodně vznikající epiteliální lišta ovlivňující tvorbu a proliferaci k ní přiléhajícího mezenchymu. Na vývoji některých z těchto struktur se zároveň podílí signalizační centrum zodpovědné za její asymetrii. V tomto textu jsou některé z těchto struktur srovnávány na základě jejich souvislosti se známými mechanismy vývoje končetin Tetrapoda a teoriemi vysvětlujícími původ párových ploutví obratlovců. S pomocí poznatků evolučně-vývojové biologie je posuzována teorie ploutevních lemů a archipterygiální teorie. Jako celek tato práce pojednává o sdílených a odvozených znacích tělních extremít obratlovců s cílem poskytnout základ budoucímu výzkumu týkajícího se rolí signálních center ve vývoji těchto extemit.

Klíčová slova: obratlovci, Gnathostomata, končetiny, ploutve, ocas, tuberculum genitale, claspers, hemipenis, AER, ZPA, Hox, Tbx, Shh, Fgf

Abstract

Vertebrate body appendages include a number of structures such as limbs, paired and median fins, the tail bud, the cloacal region, barbels or pharyngeal arch derivatives. Despite differences in form and function, these appendages share a number of developmental genetic mechanisms.

Development of these structures is chiefly regulated by Fgf, Shh, Wnt, Tgf- β and retinoic acid signalling pathways, activity of transcription factors such as Hox or Tbx along with *cis*-regulatory elements controlling the genes in which these factors are encoded.

A recurring feature shared by some of the herein discussed anatomical structures is a transient epithelial ridge whose activity influences production and proliferation of the adjacent mesenchyme. Some are also instructed by a signalling centre, which confers asymmetry to the structure.

In this text, the various appendages are compared on the basis of their development in relation to tetrapod limbs and theories evaluating the emergence of vertebrate paired appendages. The fin fold theory and archipterygial theory are discussed in the light of recent data provided by evolutionary developmental biology. All together, this thesis evaluates shared and derived characteristics of vertebrate body appendages with the aim to provide a basis for the upcoming work on the role of signalling centres in vertebrate body appendage development.

Key words: vertebrates, Gnathostomes, paired appendages, fins, tail bud, genital tubercle, claspers, hemipenis, AER, ZPA, Hox, Tbx, Shh, Fgf

Obsah

2. Končetina Tetrapoda jako modelový systém vývoje tělních extremit obratlovců	2
2.1. Iniclace vývoje končetin.....	2
2.2 Určení pozice končetin.....	3
2.2.1 Určení pozice předního páru končetin podle anteroposteriorní osy těla	4
2.2.2 Určení pozice zadního páru končetin podle anteroposteriorní osy těla	5
2.2.3 Určení dorsoventrální polohy končetin	7
2.3 Fáze vyrůstání a zpětná vazba mezi AER a ZPA	7
2.4. Evoluce regulačních mechanismů vývoje párových končetin	9
2.4.1. Evoluce transkripční regulace faktorů Tbx	9
2.4.2 Evoluce signalizace Shh ve vývoji končetin	10
2.5. Funkce genů Hox ve vývoji končetin.....	11
2.5.1 Paralogní skupina HoxD a její bimodální regulace.....	11
2.5.2 Regulace sady HoxA.....	13
2.5.3 Evoluce bimodální exprese genů HOXD	14
3. Vývoj extremit sdílejících některé mechanismy s končetinami	15
3.1 Nepárové ploutve a mediální ploutevní lem	15
3.2. Ocas.....	16
3.2.1 Společný mechanismus segmentace tělní osy a párových končetin	19
3.3. Vnější genitálie Amniota a jiné deriváty kloakální oblasti.	21
3.3.1 Vztah párových končetin a genitálního hrbolku	22
3.3.2 Hemipenisy Squamata.....	24
3.3.3 Kloakální výběžek Actinopterygii a deriváty posteriorní trávicí trubice	25
3.4. Kopulační výrůstky a hlavové laloky Chondrichthyes	26
3.5. Vousky paprskoploutvých ryb	27
3.6. Deriváty faryngeálního aparátu.....	28
4. Závěr.....	30
Literatura	32

1. Úvod

Z pozice evolučně-vývojové biologie lze pohlížet na evoluci anatomické stavby organismu jako na evoluci embryonálního vývoje, na jejímž pozadí stojí evoluce genetických mechanismů regulujících průběh ontogeneze, která představuje rozhraní na mezi genotypem a fenotypem.

Ontogeneze mnohobuněčných živočichů (Metazoa), a zvláště Bilateria, je řízena regulačními mechanismy sestávajícími z interakcí transkripčních faktorů a mezibuněčných signálních drah kódovaných několika nadrodinami genů označovaných jako vývojová sada (*developmental toolkit*). To této sady zodpovídající za vývoj většiny anatomických struktur se obvykle řadí geny kódující elementy signálních drah Hedgehog, Wnt, Fgf, Tgf- β , Notch a kyseliny retinové společně s geny kódujícími transkripční faktory volně označovanými jako selektorové geny, z nichž se nejvíce pozornosti dostává genům rodiny Hox. Vzhledem ke svému omezenému počtu jsou geny regulující ontogenezi značně pleiotropní, a proto dochází k evolučním změnám především na úrovni časového a lokálního kontextu, ve kterých jsou aktivovány (Carroll, 2005). Interpretaci kontextu, ve kterém je daný gen aktivován zajišťují enhancery (transkripční zesilovače), které představují jednu ze tříd *cis*-regulačních elementů. Vazba transkripčního faktoru na enhancer navozuje různými mechanismy stav chromatinu umožňující nasednutí RNA polymerázy na promotor daného genu (Spitz & Furlong, 2012; De Laat & Duboule 2013). Enhancery tak umožňují genům získávat funkci v závislosti na přítomnosti transkripčních faktorů v jádře buňky, což závisí na časovém a prostorovém kontextu definovaném oblastí signalizace extracelulárních faktorů. V některých případech je pro kontakt mezi enhancerem vázajícím transkripční faktor a promotorem cílového genu nutný kontakt, který zajišťují regulovaně vznikající superstruktury chromatinu nazývané jako topologicky asociované domény (TAD). (Bolt & Duboule, 2020; Beagan & Phillips-Cremins, 2020)

Dalším způsobem, kterým mohou geny získávat nové funkce, je genová duplikace. Duplikacemi vznikají homologické sekvence označované jako paralogické. Nejčastějším jevem jsou tandemové duplikace, ale vzácněji podstupují duplikaci celé genomy. Ke dvěma po sobě následujícím genomovým duplikačním událostem došlo pravděpodobně i v rané fylogenezi obratlovců. Následkem těchto dvou duplikací je řada vývojových genů přítomna ve více, obvykle čtyřech, kopiích, jejichž regulační i kódující sekvence během evoluce dále divergovaly a nabývaly funkcí v nových kontextech.

Klasická morfologie dělí končetinu Tetrapoda podél proximodistální osy na tři oddíly: stylopodium, zeugopodium a autopodium, jejichž homology byly popsány u recentních i fosilních zástupců skupiny svaloploutvých ryb (Sarcopterygii). Otázka toho, se kterou strukturou, která mohla být přítomna u hypotetického předka Gnathostomata, jsou jejich prekursori v podobě párových ploutví rybovitých obratlovců homologické, však nebyla doposud vyřešena. V průběhu 19. století byly formulovány dvě teorie vysvětlující jejich původ: teorie ploutevních lemů, interpretující dva páry ploutví coby dva izolované úseky původní spojitě laterální ploutve táhnoucí se po obou stranách trupu a archipterygiální teorie homologizující párové ploutve se žaberními oblouky.

Na přelomu 20. a 21. století otevřel evolučně vývojový přístup k evoluci obratlovců, jenž bere v úvahu genetické mechanismy, nové možnosti chápání pojmu homologie a spolu s tím i nový pohled na řešení otázky původu párových ploutví a kráčivých končetin Tetrapoda.

Z tohoto pojetí vyvstává mimo jiné i koncept takzvaných hlubinných homologií (*deep homologies*), které představují souvislosti mezi anatomickými strukturami, které jsou odhalitelné až po analýze vývojově genetických mechanismů regulujících jejich vznik. Tytéž genetické mechanismy tak mohou vytvářet struktury, které postrádají kontinuitu ve fylogenezi, ale přesto mohou být homologické ve smyslu sdílených vývojových procesů (Shubin, Tabin, & Carroll, 2009). Srovnání anatomických struktur pouze na základě jednotlivých určitých genů však postrádá z hlediska homologizace informační hodnotu a je proto třeba brát v úvahu i shody na úrovni vzájemných epistatických interakcí včetně role *cis*-regulačních elementů, které je zprostředkovávají. Epistatické interakce vývojových genů integrované *cis*-regulačními elementy je možné formálně vyjádřit pomocí genových regulačních sítí (GRN). (Peter & Davidson, 2011). Nejenom jednotlivé geny, ale i komplexní vývojové programy se tak mohou realizovat v nových časových a prostorových kontextech, a mohou se oproti původní koncepci homologie dokonce kombinovat.

Ploutve čelistnatých obratlovců (Gnathostomata) a zejména jejich deriváty v podobě párových končetin čtvernožců (Tetrapoda) představují jednu z nejpodrobněji studovaných anatomických struktur z hlediska všech výše uvedených mechanismů regulace embryonálního vývoje. Studium ostatních tělních extremit se proto nevyhnulo nacházení spojitostí právě s párovými končetinami. Následující text má za cíl nejprve podat popis mechanismů uplatňujících se při vývoji párových končetin Tetrapoda, a následně uvést přehled dalších anatomických struktur, které byly z důvodu přítomnosti některých společných mechanismů s nimi do souvislosti kladeny. Závěrem je pojednáno o možném významu těchto souvislostí pro poznání evoluce párových končetin obratlovců a obecně tělních extremit Bilateria.

2. Končetina Tetrapoda jako modelový systém vývoje tělních extremit obratlovců

2.1. Iniclace vývoje končetin

Párové končetiny se u Tetrapoda zakládají jako akumulace mezenchymu původem ze somatopleury překryté vychlípeným ektodermálním epitelem. Epitel somatopleury lokálně prochází epiteliálně-mezenchymální tranzicí (EMT) generující materiál, který posléze proliferuje a diferencuje v končetinu. K EMT dochází pod vlivem transkripčních faktorů *Twist*, *Sall4* a *Snail1* (*SnR*) (Naiche & Papaioannou, 2007; Harvey & Logan, 2006; Isaac et al., 2000) exprimovaných v LPM, které jsou regulovány transkripčními faktory Tbx (Tickle, 2015; Gros & Tabin, 2014). U všech obratlovců je pro iniciaci předního páru končetin nezbytný gen *Tbx5*, a pro iniciaci zadního páru jeho paralog *Tbx4* (Agarwal et al., 2003; Ahn et al., 2005). Transkripční faktory *Tbx4* a *Tbx5* následně v buňkách mezenchymu indukují expresi faktoru Fgf10 (*Fibroblast Growth Factor 10*), přičemž *Snail1* je možným prostředníkem mezi Tbx a Fgf (Isaac et al., 2000; Naiche & Papaioannou, 2007). Fgf10 působí v mezenchymu jako mitogen a zároveň jako faktor podporující EMT (Gros & Tabin, 2014). Signalizace Fgf10 následně aktivuje transkripci genu *Fgf8* v buňkách ektodermu prostřednictvím extracelulárního faktoru Wnt3a (Kawakami et al., 2001; Sekine et al., 1999). Mezi Fgf10 a Fgf8 se

ustanovuje pozitivní zpětná vazba udržující proliferaci mezenchymu a růst v této fázi zatím nediferencovaného základu končetiny (Tickle 2015). O nezbytnosti *Tbx5* a *Tbx4* pro uskutečnění EMT a aktivaci genů rodiny FGF svědčí stav pozorovaný u kondicionální rekombinantů v kódujících sekvencích těchto genů, u nichž dochází ke kompletní agenezi předních, resp. zadních končetin (Bickley & Logan, 2014; Rallis, 2003). V případě zadních končetin funguje mezi transkripčními faktory *Tbx4* střední člen v podobě transkripčního faktoru *Pitx1*, který je jednak esenciální pro vývoj končetin a jednak specifikuje identitu zadního páru. Ektopická exprese *Pitx1* při vývoji předního páru končetin vede k jeho homeotické transformaci v zadní pár (Spielmann et al., 2012) a snížená exprese *Pitx1* v zadních končetinách naopak vede k fenotypu bližšímu přednímu páru končetin (Domyan et al., 2016). Delece specifického regulačního elementu *Pel* (Chan et al., 2010) vede k rudimentálnímu vývoji končetin, pro který je charakteristická pravolevá asymetrie zapříčiněná částečnou funkční redundancí mezi *Pitx1a* a jeho paralogem *Pitx2* (Marcil et al., 2003). Druhá pozitivní zpětnovazebná smyčka funguje mezi *Fgf10* a faktory rodiny Wnt, kterými jsou v přední končetině *Wnt2b* a v zadní *Wnt8c* (Ng 2002). Během přechodu do fáze vyrůstání (*outgrowth*) vznikají dvě vzájemně se udržující signalizační centra: distálně lokalizovaná apikální ektodermová lišta (*apical ectodermal ridge, AER*) a posteriorně umístěná zóna polarizující aktivity (*zone of polarising activity, ZPA*). AER má podobu anteroposteriorně se táhnoucí ztlustěliny ektodermu tvořené víceřadým cylindrickým epitelem (*pseudostratified epithelium*), která sekretuje vedle *Fgf8* i *Fgf4* (Niswander & Martin, 1993). ZPA je populace mesenchymálních buněk exprimující extracelulární signální protein *Shh* nacházející se těsně pod posteriorním okrajem AER.

2.2 Určení pozice končetin

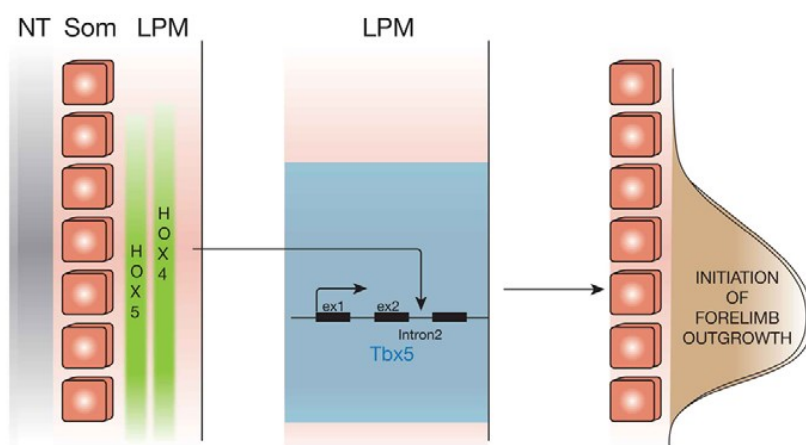
Pozici končetin v laterálním mezodermu skrze aktivaci transkripčních faktorů *Tbx* zajišťují pravděpodobně geny *Hox* kódující homeodoménové transkripční faktory, které obecně zastávají ústřední funkci v procesu regionalizace tělní osy u bilaterálních živočichů (Aires et al., 2018; Minguillon et al., 2012).

Pro geny *Hox* je příznačný časově, prostorově a kolineární vztah mezi jejich pozicí na chromozomu ve směru od 3' konce chromozomu k jeho 5' konci a umístěním oblasti, v níž jsou exprimovány, podél anteroposteriorní osy těla (Durstón, 2018). V genomu Gnathostomata se následkem dvou celogenomových duplikací nacházejí geny *Hox* ve čtyřech paralogních sadách (*clusters*) označovaných *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* a *HoxD*, z nichž ani jedna, zřejmě následkem delecí, neobsahuje všech 13 genů a pouze paralogy *Hox4*, *Hox10* a *Hox13* jsou přítomny ve všech sadách (Mallo, 2018).

Geny *Hox* jsou vedle laterálního mezodermu exprimovány i v paraxiálním mezodermu, entodermu trávicí soustavy, v žaberních obloucích a neuroektodermu počínaje rhombomero r3 rhombencefala a dále posteriorně. V anteriorních částech hlavy, v mandibulárním oblouku (Kuratani, 2005; Durstón, 2018) jsou všechny geny *Hox* inaktivní (Durstón, 2018). Anteriorní část centrální nervové soustavy je naopak u obratlovců a obecně Bilateria charakterizována expresí transkripčních faktorů *Otx* (Simeone, 1992).

Kolineární aktivace je u obratlovců umožněna globální regulací celých sad genů *Hox*, které mohou přecházet z aktivní do inaktivní konformace chromatinu v závislosti na pořadí od 5' konce chromozomu

ke 3' konci chromozomu. V anteriornějších částech těla jsou transkripčně aktivní geny, které se nacházejí blíže 5' konci a s prodlužující se tělní osou jsou směrem k 3' konci progresivně aktivovány posteriornější geny Hox. V oddílech CNS ležících anteriorně od 3. rhombomery jsou sady genů Hox zcela heterochromatizovány a tím transkripčně umlčeny (Noordermeer, 2011; Darbellay & Duboule, 2016). Domény exprese genů Hox v paraxiálním a laterálním mezodermu určují identitu kosterních derivátů somitů, kterými jsou, mimo jiné, obratle a žebra. U Tetrapoda domény exprese genů Hox předznamenávají regionalizaci páteře na cervikální, thorakální, lumbální, sakrální a kaudální oblast. Končetiny se přitom zakládají vždy v místě, kde přechází jeden oddíl ve druhý: přední končetiny se nacházejí na přechodu cervikálních a thorakálních obratlů a zadní končetiny na přechodu lumbálních a sakrálních obratlů. Počet a identita obratlů představují nezávislé znaky. Právě počet obratlů může být mezi taxony uvnitř obratlovců značně variabilní. Pozice obou párů končetin tudíž závisí na čase ve kterém nastupuje exprese příslušných genů *Hox*.



Obr.1. Aktivace genu *Tbx5* aktivitou transkripčních faktorů *Hox5* a *Hox4*.

Proteiny Hox se vážou na regulační element v 2. intronu *Tbx5*, jehož aktivace je nezbytná pro iniciaci předních končetin. ex1, exon1; ex2, exon2; LPM, laterální mezoderm, v tomto případě somatopleura; NT, neurální trubice; som, somity. Tento stav je přítomný pouze u Tetrapoda. (Minguillon et al., 2012)

2.2.1 Určení pozice předního páru končetin podle anteroposteriorní osy těla

Aktivace genu *Tbx5* v mezodermu somatopleury vyžaduje vazbu faktorů *Hoxc4* a *Hoxc5* na specifický regulační element Hsb2 (*Hox-binding sequence 2*), který se nachází ve intronu 2 genu *Tbx5* (Minguillon et al., 2012). Jednotlivé proteiny paralogní řady HoxC se liší v potenciálu aktivovat anebo naopak reprimovat transkripci *Tbx5* po navázání na sekvenci Hbs2. Protein *Hoxc9* obsahuje na rozdíl od *Hoxc5* a *Hoxc4* represivní doménu, pomocí níž rekrutuje korepresory inhibující *Tbx5*. (Petit et al., 2017; Nishimoto, 2014). Kromě Hbs2 je *Tbx5* Tetrapoda aktivován i elementem CNS12 (Adachi et al., 2016).

Pro vývoj předního páru končetin je rovněž nutná lokální represe signalizace Fgf8 působením kyseliny retinové. U myši, v jejichž genomu byl deaktivován gen *Raldh2* kódující enzym retinaldehyd dehydrogenázu, exprese *Tbx5* v mezodermu somatopleury chybí (Cunningham & Duster, 2015). Fgf8 je

na transkripční úrovni negativně regulován vazbou jaderných receptorů RXR a RAR na regulační element RARE (*retinoic acid response element*), který umožňuje, aby byla exprese genu *Fgf8* reprimována aktivitou kyseliny retinové (RA) (Kumar & Duester, 2014). Signalizace RA nejprve vytváří na úrovni budoucích předních končetin oblast mezodermu somatopleury, v níž je exprese *Fgf8* potlačena ve prospěch *Tbx5* (Zhao et al., 2009), ale v pozdější fázi vývoje končetiny, která je naopak poháněna signalizací *Fgf8* už *Tbx5* nutný není (Hasson et al., 2007). Tato oblast zahrnuje i základ srdce, v němž je gen *Tbx5* rovněž exprimován. Variabilita v pozici předního páru končetin je přinejmenším v případě ptáků determinována diferenciální časovou aktivací genů *Hox4* během migrace prekursorů laterálního mezodermu primitivním proužkem, což je také příčinou variability v počtu cervikálních obratlů, který je u savců fixní (Moreau et al., 2019).

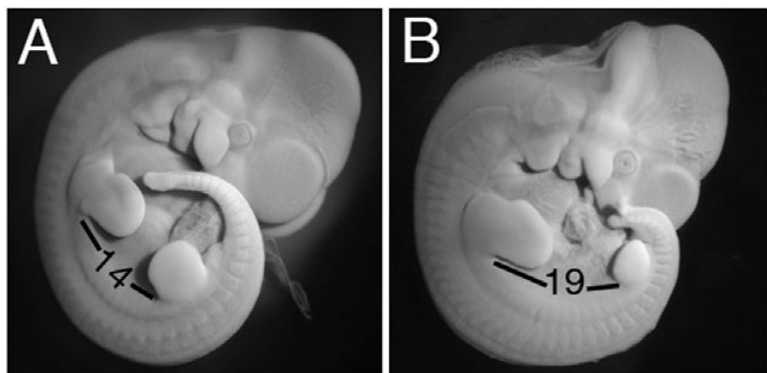
2.2.2 Určení pozice zadního páru končetin podle anteroposteriorní osy těla

Obdobně jako je tomu v případě předního páru dochází k zakládání zadního páru končetin v oblasti somatopleury exprimující určitou kombinaci genů *Hox*. Konkrétně se jedná o doménu exprese genů *Hox11*, *Hox12* a *Hox13* (Matsubara et al., 2017; Burke et al., 1995), jejichž aktivace je podmíněna signalizační aktivitou faktoru *Gdf11* (*growth/ differentiation factor 11*) náležícího do nadrodiny Tgf- β , který je z posteriorního axiálního mezodermu (*posterior axial mesoderm*, pAM) sekretován do laterálního mezodermu (LPM). K určení polohy zadních končetin dochází současně s přechodem tělní osy v ocasní primordium (ocasní hrbol, *tail bud*), pro jehož iniciaci a následný vývoj je rovněž zásadní signální aktivita *Gdf11*. (Mallo, 2018; Jurberg et al., 2013; Matsubara et al., 2017).

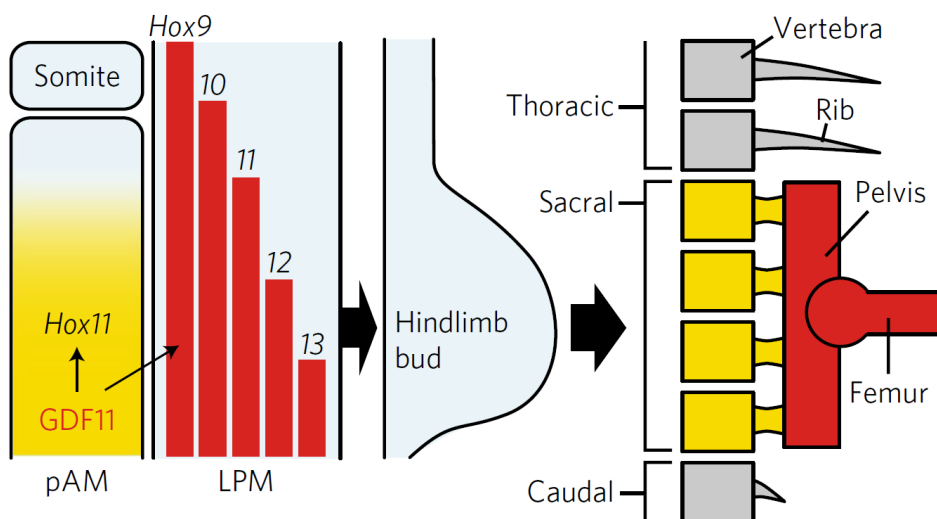
Geny *Hox9-Hox13* se někdy označují na základě pozice oblasti, kde jsou exprimovány, jako posteriorní geny *Hox*. Pro posteriorní geny *Hox* jsou příznačné takzvané vnořené domény exprese (*nested domains*) (Wellik et al., 2003). Experimentální předčasné navození exprese *Gdf11* pomocí implantátu ovlivňuje jak pozici končetin, tak expresi *Pitx1* a posteriorních genů *Hox9-Hox13* v mezodermu somatopleury.

Posteriorní geny *Hox* zřejmě stojí za iniciací zadních končetin a vůbec specifikací sakrálního oddílu páteře, jehož anteriorní rozsah odpovídá nejzazší hranici domény exprese genů *Hox11* (McPherron et al., 1999; Jurberg et al., 2013; Matsubara et al. 2017) a zároveň je gen *Pitx1* (2.1) aktivován působením transkripčního faktoru *Hoxc9* (Nishimoto et al., 2014). U jedinců s oběma inaktivními alelami genu *Gdf11* dochází naopak ke zmnožení trupových somitů a posteriornímu posunu zadního páru končetin, kloaky a ocasu. (Obr.2.) (Jurberg et al., 2013). Časová modulace exprese *Gdf11* nemá vliv na počet trupových obratlů pouze v experimentálních situacích, ale zřejmě i ve fylogenezi, čehož je dokladem skutečnost, že variabilita tohoto znaku je u jednotlivých skupin obratlovců podmíněna právě načasováním nástupu signalizace *Gdf11* v pAM. Například u myši nastupuje za fyziologických okolností exprese *Gdf11* ve stádiu se sedmi somity, přičemž se zadní končetiny zakládají na úrovni 23. - 28. somitu, zatímco v případě embryí hada *Elaphe quadrivirgata* nastupuje exprese *Gdf11* ve stádiu se 70 somity a trup přechází v ocas přibližně na úrovni 220. somitu (Matsubara et al., 2017).

Funkce *Gdf11* tudíž sjednocuje iniciaci zadních končetin, založení ocasního primordia a vznik kloakální oblasti pod jeden regulační mechanismus, který zřejmě mohl být během evoluce obratlovců jádrem heterochronických modulací ovlivňujících délku trupu.



Obr.2. Fenotyp způsobený defektem v genu *Gdf11*. **A:** normální jedinec *Mus musculus* ve stádiu E11.5., **B:** jedinec s oběma nefunkčními alelami genu *Gdf11* v témže stádiu. Patrný je posteriorní posun místa přechodu trupu v ocas a redukovaný počet kaudálních somitů. Číslo udává počet somitů nacházejících se v oblasti mezi předním a zadním párem končetin. To, že navzdory absenci signalizace *Gdf11* dochází k iniciaci zadních končetin, lze vysvětlit částečnou redundancí mezi *Gdf11* a *Gdf8* (myostatinem). (McPherron, 2009). Upraveno podle (Jurberg et al., 2013).

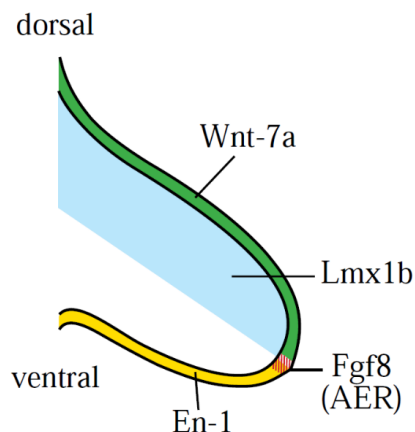


Obr.3. Schéma regulace posteriorích genů *Hox* všech paralogních sad a jejich vlivu na určení pozice zadního páru končetin. V posteriorním axiálním mezodermu (pAM) vzniká gradient signálního faktoru *Gdf11* spouštějícího expresi genů *Hox11* a všech následujících posteriorních genů *Hox* v somatopleure laterálního mezodermu (LPM), které následně definují identitu sakrálních obratlů a zároveň aktivují gen pro transkripční faktor *Pitx1* (nezobrazeno) nezbytný pro iniciaci končetin. (Matsubara et al., 2017)

2.2.3 Určení dorsoventrální polohy končetin

O poloze končetiny podél dorsoventrální osy těla rozhoduje regulace umístění apikální ektodermové lišty (AER). AER vzniká na styku dorsálního kompartmentu ektodermu charakterizovaného signalizací Wnt7a a ventrálního kompartmentu exprimujícího transkripční faktor En1 (*Engrailed*), k jehož aktivaci je v tomto kontextu nutná signalizace Bmp (Pizette et al., 2001). En1 reprimuje Wnt7a, čímž potlačuje jeho dorzalizační aktivitu (Logan et al., 1997). En1 tak zprostředkovaně reprimuje také transkripční faktor *Radical Fringe* (R-fng). Podle nejčastěji přijímaného modelu vzniká AER na pomezí buněk exprimujících *R-fng* a buněk, v nichž je *R-fng* reprimován aktivitou En1. (Rodriguez-Esteban, 1997; Laufer et al., 1997; Altabef et al., 1997). Ektopická exprese *En1* v dorzálním kompartmentu má za následek vznik ektopické AER (Tanaka et al., 1998). En-1 a Wnt7a se nepodílejí pouze na určení dorsoventrální polohy AER, ale i na pozdějším vývoji končetiny. Wnt7a rovněž specifikuje dorzální oblast mezenchymu indukcí transkripčního faktoru *Lmx1b*, v jehož absenci získává končetina částečně biventrální morfologii (Chen & Johnson, 1999). Inaktivace *En-1* má naopak za následek bidorzální fenotyp (Loomis et al., 1996).

Jedna z teorií vysvětlujících evoluci končetin nahlíží na podélně se táhnoucí apikální lišty jako na úseky nepřerušované linie z níž u hypotetického předka Gnathostomata vyrůstal jediný laterální ploutevní lem. Jako doklad ve prospěch teorie laterálních ploutevních lemů byly interpretovány experimenty, při nichž byla na dorzálním okraji domény exprese *En1* indukována ektopická končetina v oblasti mezi předním a zadním párem končetin (Tanaka et al., 2002; Cohn et al., 1995; Takeuchi et al., 1999). Tato teorie je však problematická z důvodu absence fosilního dokladu v podobě živočicha opatřeného souvislými ploutevními lemy (Coates, 2003).



Obr.4. Schéma transversálního řezu základem končetiny Tetrapoda v raném stádiu vyrůstání. Dorzální kompartment ektodermu je charakterizován signalizací Wnt7a, zatímco ventrální kompartment exprimuje transkripční faktor En-1. Na jejich styku vzniká AER sekretující Fgf8. Wnt7a indukuje transkripční faktor *Lmx1b* v buňkách dorzálního mezenchymu. (Carrol, 2005, s. 91) podle (Johnson & Tabin, 1997)

2.3 Fáze vyrůstání a zpětná vazba mezi AER a ZPA

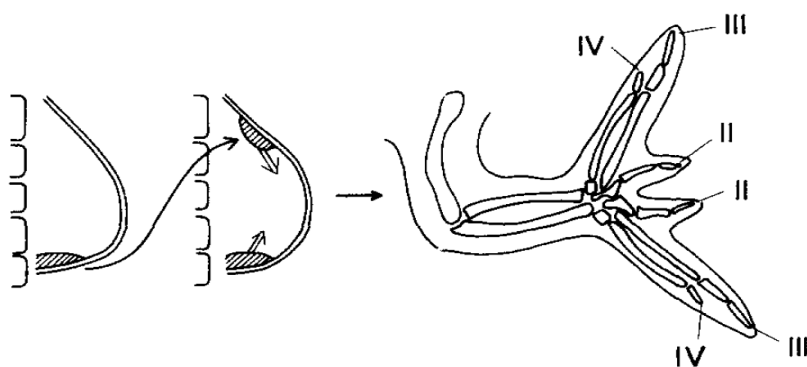
Po iniciaci, při níž z materiálu generovaného epiteliálně-mezenchymální tranzicí řízenou faktory *Tbx* vzniká nediferencované primordium, vstupuje vývoj končetiny do stádia vyrůstání (*outgrowth*). V tomto stádiu se ustanovuje pozitivní zpětnovazebná smyčka mezi dvěma signalizačními centry, z nichž je jedním AER a druhým ZPA. ZPA je populace mezenchymálních buněk sekretujících signální faktor *Shh*, která se nachází pod posteriorním okrajem AER. ZPA byla popsána na základě experimentů, při nichž byl mezenchym

z posteriorní strany vyvíjející se končetiny implantován na anteriorní stranu, čímž bylo docíleno symetrické duplikace posteriorních kosterních elementů končetiny (Saunders & Gasseling, 1968; Riddle et al., 1993). Signální dráha Hedgehog inhibuje konverzi proteinu Gli3 (též Gli3 aktivátor, Gli3A) na Gli3 represor (Gli3R, Gli3-83) (Wang, 2000). Jak *Gli3A*, tak *Gli3R* fungují jako transkripční faktory vázající se na odlišné regulační sekvence. Před ustanovením ZPA je primordium končetiny polarizováno aktivitou transkripčního faktoru *Hand2* (*heart and neural crest derivatives 2*), jehož doména exprese se vzájemně vylučuje s buňkami, v nichž je přítomný Gli3R (a bylo prokázáno, že *Hand2* je nezbytný pro aktivaci exprese *Shh* v buňkách ZPA (Tickle & Towers, 2017; Osterwalder et al., 2014; Welscher et al., 2002a,b).

Shh má při vývoji končetin vícero funkcí: polarizuje orgán v anteroposteriorním směru skrze gradient Gli3A a udržuje ektodermální expresi *Fgf8* prostřednictvím mechanismu pozitivní zpětné vazby fungující mezi AER a ZPA. Zároveň sám *Shh* působí jako mitogen, jehož aktivita urychluje buněčný cyklus (Seifert et al., 2010). Kromě *Fgf8* exprimuje AER také faktory *Fgf4*, *Fgf9*, *Fgf17* a *Wnt5a*, přičemž *Fgf8* nastupuje nejdříve a jako jediný je esenciální pro proliferaci (Mariani, 2008; Yamaguchi, 1999).

Shh dále pozitivně reguluje produkci proteinu *Grem1* působícího jako extracelulární inhibitor receptorů signální dráhy *Bmp* (Khokha, 2003). Z genů náležících do rodiny BMP jsou v základu končetiny exprimovány proteiny *Bmp2*, *Bmp4* a *Bmp7* (Pignatti et al., 2014; Bandyopadhyay et al., 2006). Signalizace *Bmp* negativně reguluje transkripci genů kódujících faktory rodiny *Fgf*, z nichž *Fgf4* udržuje v ZPA expresi *Shh* prostřednictvím represe transkripčních faktorů *Etv4* a *Etv5* (Mao et al., 2009).

Pozitivní zpětná vazba mezi AER a ZPA zajišťuje proliferaci končetinového primordia zakončenou řízenou terminací růstu po dosažení určité velikosti a stupně vývoje. Tento mechanismus musí být natolik robustní vůči vnějším perturbacím a endogenním zdrojům asymetrie (např. *Pitx2*) (Marcil et al., 2003) tak, aby bylo dosaženo identického páru končetin v situaci, kdy rostoucí základ končetiny není koordinován se svým kontralaterálnímu protějškem (Grimes, 2019; Allard & Tabin, 2009).



Obr.5. Schéma experimentu, při kterém byla transplantací oblasti ZPA (šrafovaná oblast) navozena zrcadlová duplikace posteriorních struktur autopodia kura (*Gallus gallus*). (Riddle et al., 1993 dle Saunders & Gaselling, 1968)

Rozpojení zpětné vazby, a tudíž terminace růstu končetinového primordia, je zapříčiněno tím, že buňky ZPA a jejich dceřiné buňky, pravděpodobně působením transkripčního faktoru *Tbx2* (Farin, 2013; Tickle & Towers, 2017), samy nedisponují kapacitou sekretovat *Grem1*. Proliferace buněk ZPA tak vytváří bariéru izolující oblast produkující *Grem1* od signalizace *Shh*. S rostoucí vzdáleností mezi ZPA a buňkami sekretujícími *Grem1* tudíž slábne inhibice *Bmp* až na úroveň, kdy nepostačuje k udržování exprese *Fgf4*, což má za následek zánik obou signalizačních center a následnou terminaci růstu končetinového základu. Experimentální odstranění mezenchymální tkáně mezi těmito populacemi buněk prodlužuje expresi *Grem1*, dokud není znovu dosaženo kritické vzdálenosti, při níž hladina proteinu *Grem1* již nepostačuje pro opětovnou aktivaci *Shh* (Scherz et al., 2004; Allard & Tabin, 2009). Jako další vyvažující mechanismus slouží negativní regulace *Grem1* působením proteinů *Fgf*, ke kterým dochází po dosažení vysoké koncentrace v terminační fázi (Allard & Tabin, 2009). Experimentální prodloužení trvání signalizace *Fgf* nad endogenní limit vede k oddálení terminace, hyperplázii autopodia a polyfalangii (Sanz-Ezquerro & Tickle, 2003; Allard & Tabin, 2009).

Pro popis mechanismu, kterým *Fgf8* reguluje vznik kosterních elementů autopodia, byly formulovány dva modely. Podle modelu zónu progresu (*progress zone*) buňky získávají anteroposteriorní identitu na základě času stráveného v oblasti vysoké koncentrace *Fgf8* bezprostředně pod AER, z níž jsou následkem proliferace postupně vytlačovány. Podle modelu časné specifikace je o identitě mezenchymu rozhodnuto už během iniciace. Oba tyto modely předpokládají, že v mezenchymu funguje mechanismus umožňující buňkám interpretovat čas na základě jejich vnitřní periodicity, čímž rozhoduje o identitě kosterních elementů, které z nich vzniknou (Pascoal et al., 2007).

Samotná morfogeneze chondrogenních kondenzací, z nichž se formují kosterní elementy, je regulována mechanismem na kterém se, mimo jiné, podílejí transkripční faktory *HoxA* a *HoxD* (2.5.1).

2.4. Evoluce regulačních mechanismů vývoje párových končetin

2.4.1. Evoluce transkripční regulace faktorů *Tbx*

Expresí genu *Tbx5* je v somatopleure savců aktivována přímou vazbou transkripčních faktorů *Hox* na specifický regulační element *Hbs2* v intronu 2 *Tbx5* (2.2.1.). *Hbs2* však není konzervovaný v genomu obratlovců mimo Tetrapoda (Minguillon et al., 2012). Napříč Gnathostomata naopak je evolučně konzervovaný enhancer *CNS12* regulující *Tbx5*, který zároveň postrádá funkci ve skupině Cyclostomata, u nichž se párové končetiny nevyskytují (Adachi et al., 2016).

Expresí *Tbx4* v mezodermu somatopleury je podmíněna přítomností dvou regulačních elementů označovaných jako Hind Limb Enhancer A a Hind limb Enhancer B (HLEA, HLEB), přičemž HLEB vykazuje vysokou míru konzervovanosti napříč obratlovci, a kromě zadních končetin je na rozdíl od HLEA exprimován i v základech vnějších genitálií Amniota (Menke et al., 2008).

Situace u společného předka Gnathostomata se snad podobala stavu u recentních Cephalochordata, v jejichž genomu je přítomen společný prekurzor genů *Tbx4* a *Tbx5* (*Tbx4/5*) vedle společného prekurzoru genů *Tbx2* a *Tbx3* (*Tbx2/3*). *Tbx4/5* je při vývoji kopinatce floridského (*Branchiostoma floridae*) exprimován ve

ventrálním mezodermu larev a po vnesení v transgenu může u myších jedinců s nefunkční kódující sekvencí *Tbx5* nebo *Tbx4* zastoupit funkci těchto genů při normálním vývoji končetin, a to včetně specifikace přední a zadní identity těchto končetin (Minguillon et al., 2009).

Evoluci dělby rolí mezi paralogy *Tbx4* a *Tbx5* vysvětlují dvě alternativní hypotézy. Podle hypotézy *genes before fins* byla duplikace *Tbx4/5* podmínkou, která umožnila vznik pánevního páru ploutví. Naopak podle hypotézy *fins before genes* byly oba páry nejprve identické a docházelo v nich k expresi jak *Tbx4*, tak *Tbx5* a teprve následné evoluční procesy vedl k vývoji specifických regulačních mechanismů (Ruvinsky & Gibson-Brown, 2000).

V každém případě se předpokládá, že vznik párových ploutví byl u předků Gnathostomata podmíněn získáním apomorfní domény exprese *Tbx4* a *Tbx5*, případně jejich ortologa *Tbx4/5* na dorzálním okraji oblasti exprese *En-1* (2.2.2), která je registrovatelná i na ventrální straně larev recentních mihulí (Matsuura et al., 2008; Onimaru et al. 2011) a mohla posloužit jako preadaptace pro vznik párových ploutví.

Tato ektodermální doména nemusela původně u předků Gnathostomata souviset nutně s nepřerušovaným ploutevním lemem, ale s barevným odlišením dorsální a ventrální strany těla, které je podmíněno aktivitou *En-1* nejen u Cyclostomata, ale také u Tetrapoda včetně savců (Onimaru et al., 2011; Tanaka et al., 2013). Podle alternativního scénáře jsou recentní Cyclostomata druhotně redukovanými potomky živočichů, kteří párové ploutve exprimující *Tbx4/5* měli a jejich vznik tedy předchází druhé celogenomové duplikaci (Onimaru et al., 2018). Druhotná ztráta párových ploutví zároveň není v rozporu s absencí regulačních elementů genu *Shh* (Letelier et al., 2018) homologických s elementy recentních Gnathostomata.

2.4.2 Evoluce signalizace Shh ve vývoji končetin

Expresi *Shh* v ZPA předchází anteroposteriorní polarizace končetinového základu uskutečněná skrze vzájemný antagonismus mezi transkripčními faktory Gli3R a Hand2 (Welscher, 2002). Exprese genu *Shh* je v základu končetiny podmíněna interakcí se vzdáleným regulačním elementem ZRS (*ZPA-Regulatory Sequence, MFCSI*), který se nachází v intronu 5 genu *Lmbr1* (*Limb Region 1*) vzdáleného přibližně 1 Mb od promotoru *Shh* (Lettice, 2017; Tickle & Towers, 2017). Na ZRS se vážou transkripční faktory Hand2, EtS a produkty posteriorních genů paralogní sady *HoxD*. (Tickle & Towers 2017). Hand2 také pozitivně reguluje *Shh* skrze přímou vazbu na ZRS (Osterwalder, 2014). Delece ZRS má za následek fenotyp končetin identický s fenotypem jedinců s nefunkční kódující sekvencí *Shh* (Chiang et al., 2001; Sagai et al., 2005). Defekty se však neprojevují u ostatních struktur, na kterých se podílí signalizace Shh, je-li deletována pouze ZRS (Sagai et al., 2009, 2005).

Pro normální vývoj končetin je nutný kontakt oblasti genomu obsahující *Lmbr1* a *Shh* (Williamson et al., 2016) uskutečněný v rámci topologicky asociované domény (TAD) (Symmons et al., 2016). ZRS se nachází pouze v genomu Gnathostomata, zatímco u Cyclostomata a Cephalochordata, kteří párové ploutve nemají, homologická sekvence nalezena nebyla (Smith et al., 2013). Reportér obsahující ZRS vykazuje transkripční aktivitu jak u zástupců Tetrapoda, tak zástupců Teleostei, Chondichthyes a Sarcopterygii (Letelier et al., 2018). Zajímavé je zjištění, že během evoluce Gnathostomata došlo k reorganizaci genomu, v jejímž

důsledku byl gen *Shh* translokován do blízkosti genů *Lmbr1* a *Rnf32* (Irimia et al., 2012). Kromě již zmíněné ZRS sekvence uvnitř *Lmbr1* nezbytné pro vývoj končetin se uvnitř genu *Rnf32* nachází sekvence MACS1 nezbytná pro expresi *Shh* při vývoji laryngotracheální výchlipky (Sagai et al., 2017). Jedna rekombinační událost tak umožnila vznik párových končetin a entodermálních plicních vaků: dvou inovací zásadních pro evoluci terestrických obratlovců.

2.5. Funkce genů Hox ve vývoji končetin

Charakteristickým znakem Gnathostomata je kolineární exprese posteriorních genů Hox při vývoji končetin. Funkčně, a nejspíš i fylogeneticky, lze rozdělit sady Hox na anteriorní a posteriorní geny podle oblasti tělní osy, kterou svou aktivitou specifikují. Mezi posteriorní geny náleží Hox9, Hox10, Hox11, Hox12 a Hox13. Tyto geny jsou pravděpodobně homologické genu *Abd-B* (*Abdominal B*) členovců, který rovněž specifikuje posteriorní osu těla, a je možné, že tandemovou duplikací jediného původního genu Hox u předků Bilateria vznikly ortology anteriorní skupiny (Hox1-8) a posteriorní skupiny (Hox9-13) (Peterson & Davidson, 2000). Během vývoje osy těla obratlovců podléhají posteriorní geny Hox společné regulaci působením faktoru Gdf11 a tvoří vnořené domény exprese (*nested domains*) (2.2.1.).

Specifikem Gnathostomata je rovněž globalní regulace celých sad genů Hox prostřednictvím regulačních elementů ovlivňujících všechny geny v jedné sadě (*cluster*), která tudíž funguje jako tzv. metagen (Darbellay & Duboule, 2016). Tento mechanismus není pozorován u jiných Bilateria a lze proto hovořit o genomové synapomorfii (Darbellay & Duboule, 2016).

Pro vývoj končetin mají zásadní význam posteriorní geny paralogních sad A a D. Experimentální delece celých sad B a C nevede u myši k abnormálnímu fenotypu končetin, zatímco delece buď *HoxA* anebo *HoxD* má za následek defektní vývoj autopodia a delece obou těchto sad vede k agenezi většiny končetiny, s výjimkou rudimentálního stylopodia (Zakany & Duboule, 2005).

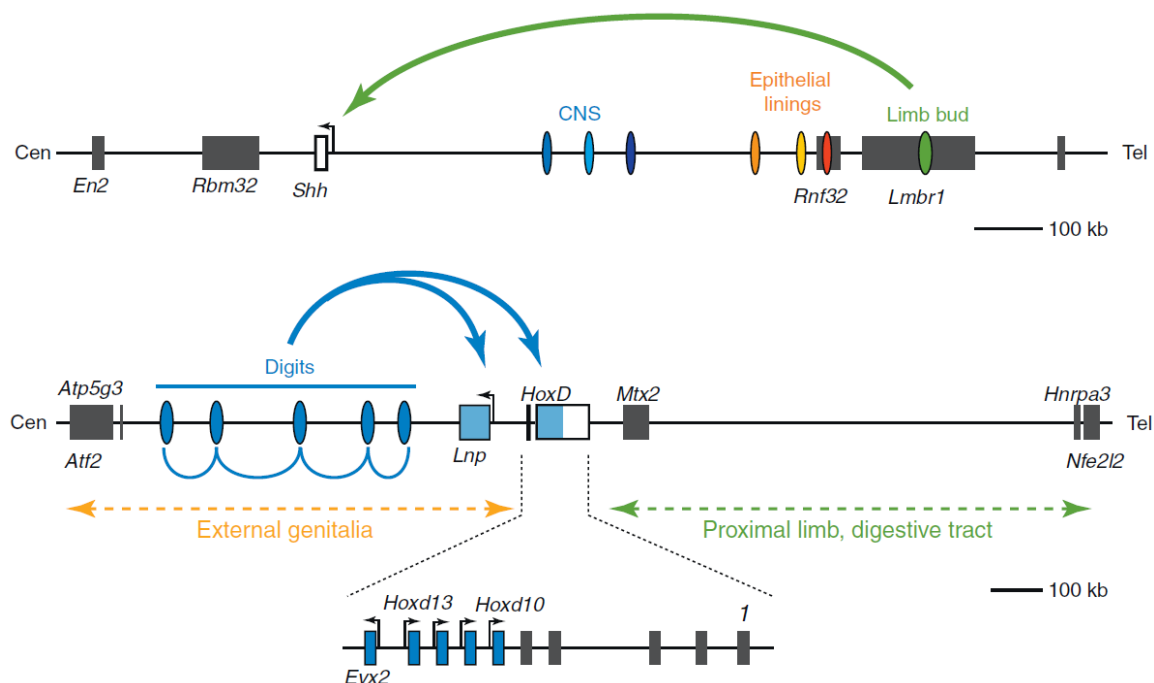
2.5.1 Paralogní skupina HoxD a její bimodální regulace

Expresce posteriorních genů *Hoxd9-Hoxd13* se během vývoje končetiny uskutečňuje ve dvou fázích, které jsou pod kontrolou odlišných regulačních celků. Oblasti lokalizace transkriptů těchto genů tvoří tzv. vnořené domény (*nested domains*). V časně fázi náleží nejrozsáhlejší doména genu *Hoxd8* a uvnitř ní jsou obsaženy domény všech ostatních genů Hox, přičemž každá další doména obsahuje všechny předcházející (Nelson, 1996). V pozdní, autopodiální, fázi se vnořené domény vytvářejí v opačném pořadí (*reverse collinearity*, *inverse collinearity*) počínaje *Hoxd13*, který je pro vznik autopodia esenciální (Fromental-Ramain et al., 1996; Nelson et al., 1996; Woltering & Duboule, 2010; Montavon et al., 2008; Archambeault et al., 2014). Inaktivace jednoho z dvojice genů *Hoxa13* a *Hoxd13* má za následek defektní vývoj a téměř kompletní agenezi autopodia, je-li provedena u obou genů. (Fromental-Ramain et al., 1996).

Oblast exprimující *Hoxd13* je nejširší, vzniká nejdříve a má v sobě obsažené domény patřící genům *Hoxd12-Hoxd9* (Montavon et al., 2008). *Hoxd9*, *Hoxd10* a *Hoxd11* jsou přitom exprimovány v obou fázích (Woltering et al., 2014). Geny pozdní fáze vykazují rovněž kvantitativní kolinearitu ve smyslu klesající

dózev závislosti na pořadí od 5' konce a tím rostoucí vzdálenosti od regulačních sekvencí (Tschopp & Duboule, 2011a, b; Montavon et al., 2008; Kmita et al., 2002; Woltering & Duboule, 2010). Vnořené domény se v autopodiu tvoří v anteroposteriorním směru, přičemž se oblast exprimující pouze *Hoxd13* nachází na anteriorním okraji autopodia a oblast překryvu domén lokalizace transkriptů všech genů *HoxD* odpovídá posteriorně umístěnému ZPA (Davis, 2013, Woltering & Duboule, 2010), jejíž produkt *Shh* je v této fázi nezbytný pro aktivaci obou sad *Hox*.

Přechod z časné do pozdní fáze je doprovázen změnou konformace chromatinu zprostředkovanou činností *Hoxd13* a *Hoxa13* (Beccari, L. et al. 2016) při které *HoxD* interagují v rámci dvou topologicky asociovaných domén (TAD) s regulačními sekvencemi, které celek *HOXD* ohraničují. Časná fáze je řízena elementy CS39 a CS65 (Beccari et al., 2016) nacházejícími se v telomerickém 3' směru od *HoxD* (T-DOM), zatímco pozdní fáze je řízena elementy v 5' centromerickém směru (C-DOM). Uvnitř C-DOM se nachází regulační element *Prox* obsahující sekvenci *CsC* a element *GCR* (*Global control region*) obsahující sekvence *CsB* a *CsA*. Spolu s *HoxD* jsou těmito elementy regulovány geny *Lnp* a *Evx2*, mezi nimiž se *Prox* a *CsC* nachází (Spitz et al., 2003). *CsB* řídí expresi *HoxD* v končetinách, neurální trubici a genitálním hrbolku, ale nepostačuje k plné rekapitulaci exprese *HoxD* v autopodiu (Gonzalez et al., 2007; Davis, 2013). Během samotného přechodu nejsou *HoxD* pod silným stimulujícím vlivem ani jedné z regulačních domén, což vede ke vzniku oblasti LHZ (*Low Hox Zone*) s nízkou dózou transkriptů *HoxD* (Woltering & Duboule, 2010; Andrey et al., 2013). Předpokládá se, že přítomnost LHZ je zodpovědná za vznik karpální oblasti (mesopodia) (Tulenko et al., 2016; Woltering & Duboule, 2010; Woltering, 2014).



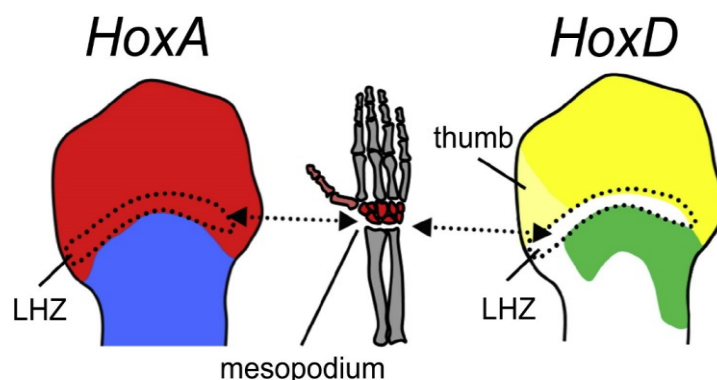
Obr.6. Schéma regulace genu *Shh* a paralogní skupiny *HoxD*. A: sekvence ZRS (MFCS1) uvnitř genu *Lmbr1* aktivuje expresi *Shh* v základech párových končetin B: Centromerické regulační elementy aktivují posteriorní geny sady *HoxD* v základech párových končetin a vnějších genitálií. (Schéma nezohledňuje efekt TAD). Upraveno podle (Montavon & Duboule, 2013)

2.5.2 Regulace sady HoxA

HoxA jsou podobně jako *HoxD* ohraničeny oblastmi obsahujícími regulační elementy, s nimiž mohou vytvářet kontakty v rámci TAD (Berlivet et al., 2013), ale jsou na rozdíl od *HoxD* exprimovány pouze v jedné vlně a spolu s transkripčním faktorem *Meis1* specifikují jednotlivé oddíly podél proximodistální osy končetiny. *Hoxa13* specifikuje autopodium a karpus, *Hoxa11* zeugopodium a *Meis1* stylopodium (Nelson, 1996; Yano & Tamura, 2013). *HoxA* se také na rozdíl od *Hoxd13* a *Hoxd11* vzájemně vylučují a *nested domains* nevytvářejí (Kherdjemil et al., 2016).

U Tetrapoda se namísto toho domény exprese *Hoxa13* a *Hoxa11* překrývají jen po určitou dobu a následně dochází k jejich postupné separaci. Jiná je situace u bazálních Actinopterygii (*Polyodon spathula*) a Chondrichthyes (Sakamoto, 2009; Metscher et al., 2005; Yano & Tamura, 2013). V ontogenezi zástupců těchto skupin není při vývoji ploutví doména exprese *Hoxa11* separovaná od domény exprese *Hoxa13* (Metscher, 2005). Odvozený stav u Tetrapoda je pravděpodobně výsledkem represivní aktivity obou genů *Hox13* zprostředkované antisense RNA inaktivující *Hox11*, jejíž syntéza je spuštěna po navázání *Hoxa13* nebo *Hoxd13* na regulační element nacházející se v intronu *Hoxa11* (Kherdjemil et al., 2016; Petit et al., 2017). *Shh* je pozitivně regulován vazebnými místy uvnitř ZRS, která jsou specifická pro každou z obou fází (Lettice et al., 2017; Leal & Cohn, 2016). Aktivita *Hoxa13* zároveň vysvětluje vznik LHZ (2.5.1). Tato oblast je zároveň oblastí, ve které se *Hoxa13* a *HoxD* nepřekrývají. Právě *Hoxa13*, jehož exprese se jinak v autopodiu překrývá s *HoxD*, může být faktorem určujícím morfologii karpálních kostí: ektopická exprese *Hoxd13* vede k homeotické transformaci dlouhých kostí zeugopodia v kosti morfologicky podobné karpálním. (Yokouchi, 1995). Funkce *Hoxa13* při určení karpální oblasti částečně vysvětluje i přechodnou morfologii nejanteriornějšího prstu, savčího palce. Oblast, v níž vzniká palec, je charakterizována expresí *Hoxa13*

a pouze jediného členu sady *HoxD*, kterým je *Hoxd13*, přičemž odstranění *Hoxd13* vede k transformaci palce v karpální kost (Woltering & Duboule, 2010).



Obr.7. Schéma domén exprese sad HoxA a HoxD během vývoje savčího autopodia. Doména *Hoxa13* (červeně) se nepřekrývá s doménou *Hoxa11* (modře). Mezi doménou distální fáze *Hoxd10-Hoxd13* (žlutě) a doménou proximální fáze *HoxD* (zeleně) se nachází zóna s nízkou dózou transkriptů *HoxD* (LHZ). V pozdní fázi je exprese *HoxD* aktivována signalizací *Shh* z posteriorní ZPA. V oblasti budoucího palce (thumb) je dóza *HoxD* relativně nízká. (Woltering & Duboule, 2010)

2.5.3 Evoluce bimodální exprese genů HOXD

Lze předpokládat, že během procesu dvou celogenomových duplikací, který vedl ke čtyřem paralogním sadám genů *Hox*, vznikl v prvním kroku společný prekurzor sad A a B (*HoxA/B*) a prekurzor C a D (*HoxC/D*) (Soshnikova et al., 2013). Je pravděpodobné, že bimodální regulační mechanismus typický pro *HoxA* a *HoxD*, je původním znakem, který byl přítomný u genů *Hox* před replikačními událostmi na bázi obratlovců, jehož druhotná ztráta u *HoxB* a *HoxC* může souviset s delecemi krajních genů (Woltering et al., 2014). Končetinové regulační sekvence však vznikly u *HoxD* a *HoxA* konvergentně (Berlivet et al., 2013). Oblasti ohraničující jedinou sadu genů *Hox* u Cephalochordata je na anteriorní straně vysoce syntenicky konzervovaná, zatímco na posteriorní straně došlo ve srovnání s obratlovci k rozsáhlým reorganizacím. Analýza interakcí sady *Hox* zároveň svědčí o preferenčním vytváření kontaktů právě s anteriorními sekvencemi v rámci jedné, nikoli dvou TAD. Tento stav může vypovídat o působení selekčních tlaků zabraňujících mutacím v anteriorní oblasti, avšak ne v posteriorní (Acemel et al., 2016). Globální telomerická (anteriorní) regulace genů *Hox* se tudíž jeví jako inovace Gnathostomata.

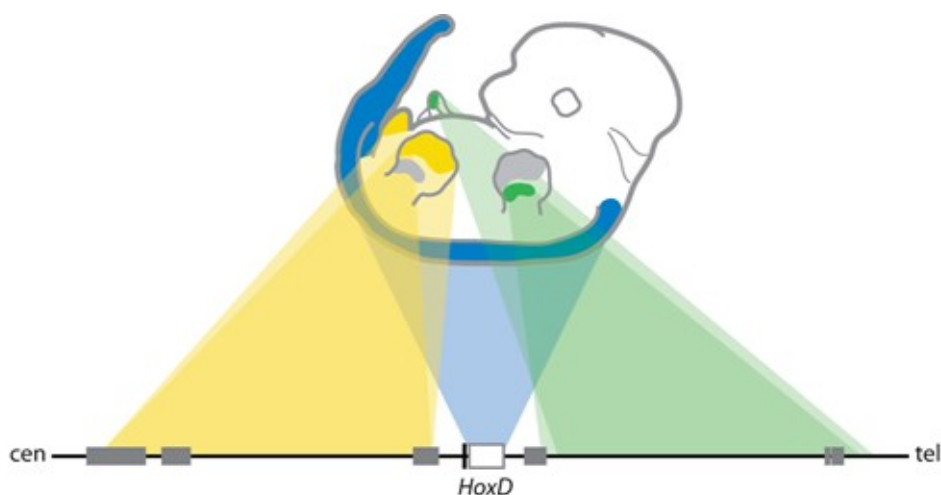
Zprvu se na základě situace u fylogeneticky odvozených Teleostei (*Tetraodon nigroviridis* a *Danio rerio*) (Sordino et al., 1995; Schneider & Shubin, 2013) předpokládalo, že dvoufázová (bimodální) exprese genů *HoxD* je apomorfií Tetrapoda související se vznikem autopodia (Spitz et al., 2003). Studium vývoje ploutví u zástupců Dipnoi (*Neoceratodus forsteri*) (Johanson, 2007), bazálních Actinopterygii (*Polyodon spathula*) (Davis et al., 2007; Tulenko et al., 2016) a Chondrichthyes (*Scyliorhinus canicula*, *Leucoraja erinacea*), (Freitas, 2007; Spitz et al., 2003) však odhalilo, že k oběma fázím dochází, byť s menším až nepatrným časovým a prostorovým rozestupem. Na *Danio rerio*, modelovém zástupci Teleostei byla rovněž demonstrována rudimentální pozdní fáze exprese sady *HoxD* (Ahn & Ho, 2008). Rozdíl mezi stavem u Tetrapoda a skupin bez autopodia proto zřejmě spočívá v evoluci na úrovni *cis*-regulačních elementů.

Centromerické (distální, posteriorní), regulační elementy Island 1, Island 3, Island 5 a CsB jsou přítomny napříč Gnathostomata, přičemž CsB naklonovaný z *Danio rerio* (Schneider et al., 2011), *Lepisosteus oculatus* (Gehrke, 2015) a *Leucoraja erinacea* (Archambeault, 2014; Schneider, 2011) vykazuje transkripční aktivitu v autopodiu savců. Na druhou stranu CsB naklonovaný z genomu *Tetraodon viridis* a *Danio rerio* savčími buňkami interpretován není (Spitz et al., 2003; Paço & Freitas, 2018; Gehrke et al., 2015), což poukazuje na sekundární degradaci tohoto elementu jako na možné vysvětlení absence distální fáze exprese *HoxD* při vývoji ploutví recentních Teleostei. U Tetrapoda navíc CsB obsahuje konzervované sekvence B1 a B2, které nemají homology v genomu jiných skupin (Spitz et al., 2003).

V centromerické regulační oblasti Tetrapoda se však nacházejí i unikátní sekvence, jejichž aktivita může být příčinou modulace distální fáze, která doprovázela vznik autopodia. Konkrétně se jedná o elementy CsC, Island 4 a Island 2, z nichž je Island 2 je přítomný v genomu zástupce Sarcopterygii *Latimeria chalumnae* (Amemiya et al., 2013). Savčí CsC sice vykazuje reportérovou aktivitu u *Danio rerio*, což poukazuje na konzervovanost *trans*-regulačního aparátu, avšak jemu ortologická sekvence se v genomu daného druhu nenachází (Gonzalez et al., 2007; Schneider et al., 2011; Schneider & Shubin 2013; Freitas, 2007).

O přítomnosti autopodiální fáze svědčí i zjištění, že exprese *HoxD* a *HoxA* je během vývoje distální části párových ploutví *Danio rerio* stejně jako u Tetrapoda řízena signalizací Shh (Ahn, 2008).

Jeví se tak jako pravděpodobné, že bimodální regulace genů *HoxD* je původním znakem Gnathostomata, který byl přítomný u společného předka obratlovců s párovými končetinami a byl v určité podobě přítomný i před celogenomovými duplikacemi, které přecházely vzniku obratlovců. K expresi posteriorních genů *HoxD* řízených telomerickou regulační oblastí dochází i během vývoje savčího slepého střeva (*caecum*) (Delpretti, 2013) a genitálního hrbolku (*tuberculum genitale*) (Lonfat et al., 2014). V obou z případů tak se na aktivaci *HoxD* podílejí některé společné a některé pro danou strukturu unikátní cis-regulační elementy, se kterými *HoxD* interagují v rámci TAD (Darbellay & Duboule, 2016).



Obr.8. Schéma oblastí aktivity jednotlivých regulačních oblastí celku *HoxD* během savčí ontogeneze. Centromerické regulační sekvence aktivují expresi genů *HoxD* v autopodiu a genitálním hrbolku (žlutě). Telomerické sekvence aktivují expresi *HoxD* v proximálnějších oddílech končetiny a slepém střevě (zeleně). Exprese *HoxD* v tělní ose je řízena elementy nacházejícími se v sekvencích mezi jednotlivými geny *HoxD* (modře). (Tschopp & Duboule, 2011a)

3. Vývoj extremit sdílejících některé mechanismy s končetinami

3.1 Nepárové ploutve a mediální ploutevní lem

U Actinopterygii je distální kostra mediálních ploutví a distální oddíl kostry párových ploutví tvořen desmogenními lepidotrichiemi, které osifikují podél aktinotrichií tvořených kolagenem a elastoidinem, zatímco u Chondrichthyes k osifikaci nedochází, a i v dospělosti jsou přítomny pouze chrupavčité ceratotrichie. Ploutevní lem larev recentních Tetrapoda neobsahuje žádné kosterní struktury. Lepidotrichie jsou však patrné na ploutvích fosilních zástupců Sarcopterygii jako *Tiktaalik* nebo *Panderichthys* (Yano & Tamura, 2013).

Kaudální, anální a obě hřbetní ploutve, máčky skvrnitě (*Scyliorhinus canicula*) vykazují kolineární uspořádání domén exprese genů *Hoxd9-Hoxd13* odpovídající rané fázi vývoje končetin (Freitas, 2006). Jako doklad toho, že se jedná o fylogeneticky starší stav, slouží exprese *HoxD* ve hřbetní ploutvi

mihule mořské (*Petromyzon marinus*), při jejímž vývoji dochází, podobně jako v případě máčky, ke kolineární expresi *Hoxd9* a *Hoxd10* ve vnořených doménách. (Freitas et al., 2006).

V mediálních ploutvích Cyclostomata však na rozdíl od Gnathostomata nepůsobí signalizace zprostředkovaná proteinem Shh, jehož exprese je patrná u zástupců Chondrichthyes *Chiloscyllium punctatum* a *Leucoraja erinacea* (Davis, Dahn & Shubin, 2007). Exprese genu Shh v je párových ploutvích řízena konzervovaným regulačním elementem ZRS, jehož delece u Tetrapoda vede k rudimentálnímu vývoji končetin (Sagai et al., 2005). Delece ZRS u zástupců Teleostei *Danio rerio* a *Oryzias latipes* vede k agenezi hřbetní ploutve, což poukazuje na neoddelitelné spřažení vývoje obou struktur podmíněné nezastupitelnou funkcí ZRS pro aktivaci *Shh*. Párové ploutve se u zástupců Teleostei navzdory deleci ZRS vyvíjejí díky aktivitě nově získaného elementu sZRS (*shadow ZRS*), který se rovněž nachází ve druhém intronu *Lmbr1* (Letelier et al., 2018). Zda-li je absence ZRS u recentních Cyclostomata sekundární či ne, zůstává nejasné (Letelier et al., 2018; Irimia, 2012; Ruvinsky & Gibson-Brown, 2000; Onimaru & Kuraku, 2018).

K expresi posteriorních genů *HoxD* v mediálních ploutvích proto zřejmě docházelo už u předků Gnathostoma, u nichž je navíc podmíněna signalizací Shh. Za současného stavu znalostí nelze s jistotou říci, jestli je funkce ZRS při vývoji mediálních ploutví evolučně starší než funkce v párových ploutvích. V případě, že by se tento scénář ukázal jako pravděpodobný, by mohla případná pleziomorfni role ZRS sloužit jako důkaz ve prospěch modelu, podle kterého jsou párové ploutve aspoň z části výsledkem kooperace regulačních mechanismů podílejících se na vývoji hřbetních ploutví.

Na základě výše popsaných experimentů byla přítomnost některých mechanismů, které fungují jak v mediálních, tak v párových ploutvích rybovitých obratlovců interpretována jako jeden z hlavních argumentů ve prospěch teorie ploutevních lemů (Gillis & Hall, 2016).

3.2. Ocas

Ocas definovaný jako oddíl tělní osy zasahující posteriorně od kloakální oblasti je charakteristickým synapomorfniím znakem skupiny Chordata včetně obratlovců. Vývoj ocasu je regulován odlišně od vývoje anteriornějších oddílů tělní osy a zároveň se v některých rysech podobá vývoji párových končetin a byl proto také považován za strukturu, z níž mohly být kooptovány některé mechanismy vývoje končetin.

Již bylo uvedeno (2.2.2), že přechod tělní osy v ocas se odehrává pod vlivem signálního faktoru Gdf11 sekretovaného z paraxiálního mezodermu do mezodermu somatopleury, přičemž heterochronie v nástupu exprese *Gdf11* zároveň rozhoduje jak o délce trupu a počtu somitů s trupovou identitou, tak o umístění zadního páru končetin, resp. pánevních ploutví. Gdf11 aktivuje posteriorní geny *Hox9-13*, jejichž exprese ve vnořených doménách charakterizuje jak ocas a sakrální oddíl páteře (Obr.3), tak proximodistální osu končetin a párových ploutví (2.5).

Anteroposteriorní (kraniálně-kaudální) osa těla vzniká postupně během gastrulace, při níž je z ektodermu, resp. epiblastu (ve skupině Amniota) generován epiteliálně mezenchymální tranzicií mezoderm. Místem gastrulace je u obratlovců blastoporus anebo, v případě Amniota, primitivní proužek (*primitive streak*, PS). Vznikající laterální mezoderm, paraxiální mezoderm, a chordamezoderm se posouvá

v anteriorním směru, zatímco blastoporus, resp. primitivní proužek ustupuje kaudálně. V průběhu gastrulace začínají z anteriorního konce paraxiálního mezodermu diferencovat metamerické somity v podobě epiteliálních váčků kondezujících z nerozlišeného presomitického mezodermu (PSM), které později slouží jako základ svalových a kosterních struktur trupu. (Bénazéraf & Pourquié, 2013)

Po nástupu signalizace Gdf11 se primitivní proužek dostává na ventrální stranu těla a dává vzniknout ventrální ektodermové liště (*ventral ectodermal ridge*, VER), která vykazuje morfologickou podobnost s AER končetiny, přičemž sekretuje faktory Fgf17 a Bmp2 a po určitou dobu je v ní nadále generován mezenchym. (Bénazéraf & Pourquié, 2013; Goldman, 2000; Ohta et al., 2007). Anteriorní část primitivního proužku a struktura na jeho anteriorním konci zvaná Hensenův uzel se přeměňují v oblast označovanou jakou *chordoneural hinge* (CNH), do níž se z primitivního proužku přesouvají neuromezodermální progenitorové buňky (NMP), čímž se zakládá posteriorně rostoucí mezenchymální ocasní primordium (*tail bud*).

K neurulaci a somitogenezi dochází v mezenchymu ocasního primordia (*tail bud mezenchyme*, TBM) *de novo*, sekundárně, bez návaznosti na trupový oddíl tělní osy postupnou diferenciací bipotenciální populace NMP. NMP jsou charakteristické současnou expresí transkripčních faktorů Sox2 a T(Bra) (Wymeersch et al., 2016). NMP mohou v závislosti na rovnováze extracelulárních signálů diferencovat buď v paraxiální mezoderm exprimující pouze *T(bra)* nebo v sekundární neurální trubici definovanou expresí genu *Sox2*. Za nepřítomnosti signální aktivity faktoru Gdf11 je diferenciací NMP nakloněna ve prospěch neurulace působením *Sox2* (Aires et al., 2019).

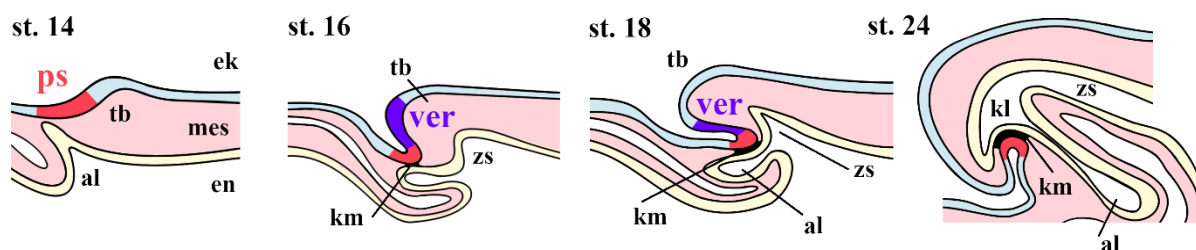
K terminaci růstu ocasu dochází po vyčerpání mezenchymální populace NMP, čemuž dočasně zabraňuje aktivita posteriorně sekretovaných faktorů Fgf8, vůči nimž působí antagonisticky anteriorně sekretovaná kyselina retinová (Olivera-Martinez et al., 2012). Represe Fgf8 působením RA je i v tomto případě zajištěna regulačním elementem RARE, který rovněž zaručuje represí Fgf8 během zakládání předního páru končetin Tetrapoda (Kumar & Duester, 2014; Cunningham et al., 2015) (2.1) (2.4.2).

Posteriorní geny Hox exprimované v sakrální oblasti a v ocasu nenáleží na rozdíl od párových končetin pouze k sadám HoxD a HoxA, ale také k HoxC a HoxB. (Soshnikova & Duboule, 2009; Burke et al., 1995) Předčasná exprese Hoxb13 nebo Hoxc13 terminuje proliferaci NMP a tím i růst ocasu, naopak delece Hoxb13 vede k jeho hyperplázii (Mallo, 2019). Pozice přechodu trupu v ocas je podmíněna interakcí dvou signálních faktorů nadrodiny Tgf- β : Gdf11 a Oct4. Delece *Gdf11* vede k opožděnému založení ocasu a zmnožení lumbálních obratlů, zatímco předčasná exprese *Gdf11* má naopak za následek anteriorní posun zadního páru končetin doprovázený redukcí počtu trupových obratlů. Vůči Gdf11 působí antagonisticky faktor Oct4, přičemž trvání jeho aktivity určuje délku trupu (Mallo, 2019, 2018; Jurberg et al., 2013). Gdf11 udržuje bipotenciální neuro-mezodermální progenitorové (NMP) buňky v proliferujícím a nediferencovaném stavu aktivací transkripčního faktoru Lin28, proti němuž působí Hoxb13 a Hoxc13, které jsou rovněž aktivovány signalizací Gdf11 (Aires, 2019). Rozdíl v nástupu aktivity Hoxb13 a Hoxc13 stojí na pozadí variability délky ocasu u obratlovců. (Mallo, 2019).

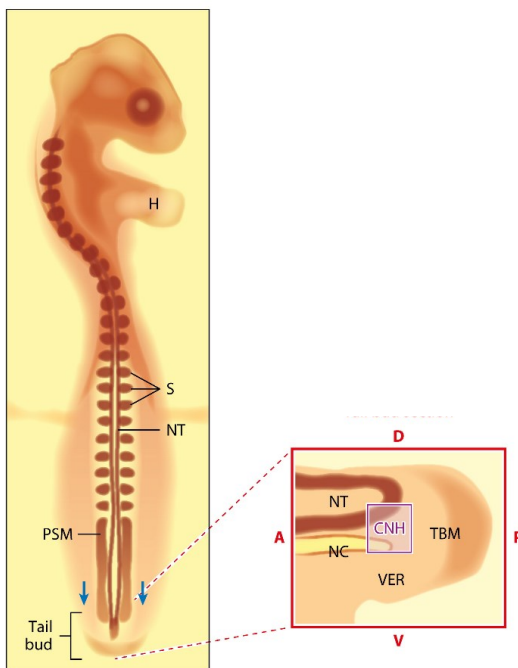
Pro pokračující EMT je ve ventrální ectodermové liště nutný inhibitor signalizace Bmp Noggin. *Bmp2* je exprimován jak v AER končetin, tak ve VER ocasu (Cotoras & Allende, 2015; Ohta et al., 2007).

Posteriorní geny *Hox9-Hox13* reprimují s kolineárně rostoucí intenzitou transkripční faktor T(Bra) prostřednictvím inkativace parakrinního signálu *Wnt5a*, který zřejmě má roli i v udržování gradientu *Fgf8*. (Denans, 2016).

S předními končetinami sdílí ocasní primordium permissivní funkci RA při potlačení signalizace *Fgf8* během iniciace obou struktur, která však v případě zadních končetin není nutná (Zhao et al., 2009; Cunningham et al., 2015). Ocas se společně se zadními končetinami zakládá vlivem signalizace *Gdf11*, která hraje zásadní roli i v jeho následném vývoji včetně terminace růstu (Mallo, 2018, 2019). *Oct4* aktivuje anteriorní geny *Hox* všech čtyř sad specififikující trup, zatímco posteriorní geny *Hox* aktivované působením *Gdf11* specifikuji sakrální oddíl páteře a ocas. Posteriorní geny sad *HoxD* a *HoxA* jsou exprimovány i ve vývoji končetin, přičemž geny *HoxD* jsou aktivovány nejprve regulačními elementy v centromerické oblasti a později v opačném pořadí elementy v telomerické oblasti (2.5.1). Je možné, že přechod mezi geny řízenými *Oct4* a *Gdf11* odpovídá přechodu mezi obdobnými topologicky asociovanými doménami, v rámci nichž je posteriorní část sady *HoxD* regulována během vývoje párových končetin (Mallo, 2018).



Obr.10. Schématická ilustrace embryogeneze kaudální oblasti kura. **kl**, kloaka; **km**, kloakální membrána; **zs**, zadní střevo; **ps**, primitivní proužek (*primitive streak*); **tb**, *tailbud*; **ver**, ventrální ectodermová lišta; **al**, alantois. Upraveno podle (Ohta et al., 2007).



Obr.9. Ilustrace embrya kura (*Gallus gallus*) ve stádiu 15. **Vlevo:** primitivní proužek generuje presomitický mezoderm (**PSM**), který anteriorněji diferencuje v somity (**S**), přičemž PS ustupuje posteriorně (**modré šipky**). **NT:** nervová trubice (*neural tube*). **H:** srdeční hrbol (*heart*). **Vpravo:** laterální řez primordií ocasu (*tail bud*). Část primitivního proužku se přesouvá na ventrální stranu a dává vzniknout ventrální ektodermové liště (**VER**). **NC:** notochord, **CNH:** *caudal neural hinge*, **NT:** nervová trubice, **TBM:** mezenchym ocasního primordia (*tail bud mesenchyme*). Upraveno podle (Bénazéraf & Pourquié, 2013).

3.2.1 Společný mechanismus segmentace tělní osy a párových končetin

Základem pro mezodermální seriálně homologické struktury obratlovců jsou somity vznikající jako epiteliální váčky, které postupně a s fixní periodicitou diferencují z nerozlišeného mezenchymu (*pre-somitic mesoderm*, **PSM**). Podle nejúspěšnějšího modelu popisujícího mechanismus somitogeneze (*clock and wavefront model*) vstupují buňky PSM synchronizovaně a s fixní periodou do stavu, kdy mají potenciál formovat somity, k čemuž dochází pouze tehdy, pokud se dostanou z dosahu signálu, který tvoří gradient s maximem koncentrace na posteriorní konci vznikající tělní osy embrya. Nový mezenchym PSM je generován v blastoporu, resp. primitivním proužku, odkud se posouvá dále anteriorně, dokud nepřekročí kritickou hranici koncentrace signálních faktorů (*wavefront*, *differentiation front*) udržujících PSM v nediferencovaném stavu (Naiche, 2011).

Jako jádro tohoto oscilujícího mechanismu byly u Amniota určeny efekторы signální dráhy Notch kódované v genech náležících do rodiny *Hes* (*hairy/enhancer-of-split*) (Resende et al., 2014; Sheeba et al., 2012), jejichž exprese je u savců zaznamenatelná s prodlevou přibližně 90 min a u ptáků asi 120 min. Faktory *Hes* po své aktivaci reprimují vlastní expresi, čímž cyklicky navracejí systém do počátečního stavu. Juxtakrinní signální dráha Notch zprostředkovává mezi buňkami, jejichž povrchy jsou vzájemně v kontaktu, synchronizaci vnitřních procesů, kterým je v tomto případě právě fáze oscilující exprese faktorů rodiny *Hes* (Pourquie, 2011; Sheeba et al., 2016).

Během embryonálního vývoje hadů je perioda cyklu exprese *Hes1* a *Hes7* v poměru s celkovou délkou těla asi čtyřikrát rychlejší než u obratlovců s kratší tělní osou (Gomez et al., 2008). Zmnožení počtu somitů bylo dosaženo i při experimentální manipulaci sekvence *Hes7* myši (Harima et al., 2013).

Heterochronická modulace exprese genů *Hes* tudíž je zřejmě spolu s načasováním nástupu signalizace Gdf11 (2.2.1) jedním z mechanismů na pozadí variability v počtu somitů u různých skupin obratlovců.

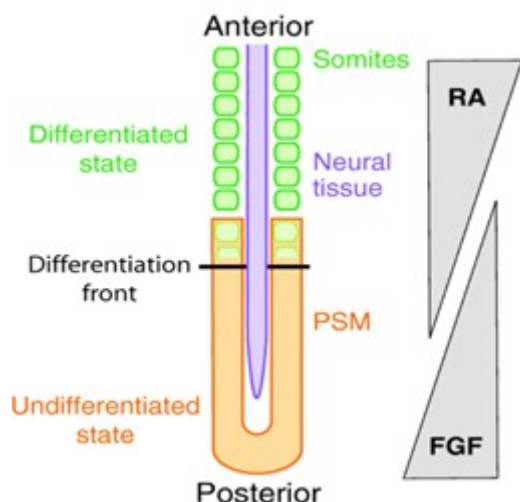
Jako signální molekula, jejíž gradient v PSM plní funkci diferenciačního předělu byl určen faktor Fgf8, jehož deaktivace vede v daném stádiu k neorganizované a časově neregulované diferenciaci v somity (Naiche et al., 2011) Fgf8 je produkován posteriorní oblastí PSM a později TBM, přičemž jeho exprese je udržována aktivitou faktoru Wnt3a. Proti Fgf8 naopak působí antagonisticky anteriorně sekretovaná

kyselina retinová (Sheeba et al., 2016). Intenzita signalizace Fgf8 se působením kyseliny retinové anteriorně snižuje a po dosažení prahové hodnoty (*wavefront*) již déle nepostačuje k represí somitogeneze. V případě, že je tento gradient experimentálně vytvořen z opačné strany aplikací kyseliny retinové na amputovaný ocas, dochází k homeotické transformaci ocasu v sakrální oblast včetně kompletních ektopických končetin (Morioka et al., 2018)

K přidávání metamerických elementů s fixní periodicitou však nedochází pouze v PSM, ale i v mezenchymu vyvíjející se končetiny Tetrapoda. U kura trvá jeden cyklus asi 12 h. V souladu s tím byla v nediferencovaném mezenchymu končetiny registrována periodická exprese genu *hairy2*, který je spolu s faktory oscilujícími v PSM členem rodiny *Hes* (Pascoal et al. 2007). I v tomto případě kondenzují mezenchymální buňky v základy metamerických kosterních elementů poté, co opustí oblast vysoké koncentrace Fgf8 sekretovaného z AER (*progress zone*) (2.3) a signalizací Shh sekretovaným ze ZPA. (Sheeba et al., 2012) V souladu s analogickou funkcí buněčných oscilátorů je i přítomnost exprese faktorů signální dráhy Notch v mezenchymu základu končetiny (Pascoal et al., 2007). Na spojitost mezi zvýšeným počtem ocasních obratlů a zmnožením článků prstů (hyperfalangií) během fylogeneze obratlovců bylo upozorněno ještě před objevem cyklické exprese genu *hairy2*, a to v souvislosti právě s trváním signalizace Fgf (Richardson et al., 2004).

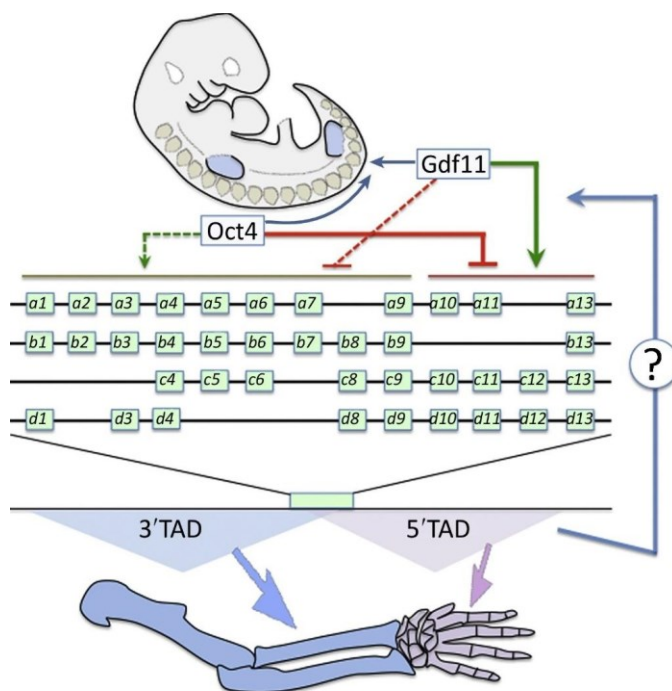
Vzhledem k tomu, že pozitivní zpětná vazba mezi faktory Fgf a Wnt funguje při vývoji ocasu Cephalochordata, lze považovat ocas za evolučně nejstarší strukturu, v níž se tento mechanismus uplatňuje. Později mohl být právě z ocasu kooptován do párových končetin (2.1) a vnějších genitálií (3.3), pro jejichž iniciaci je interakce faktorů Fgf8 a Wnt rovněž zásadní (Naiche, 2011; Schubert et al., 2000).

Ocas obratlovců zároveň tvoří na vývojové, a zřejmě i evoluční úrovni, spolu s končetinami a deriváty kloakální oblasti jednotný modul, který je integrován aktivitou signálního faktoru Gdf11 (2.2.1). V souvislosti s Gdf11 byla formulována hypotéza, podle níž je přechod tělní osy v ocas podmíněn stejným regulačním mechanismem na úrovni TAD jako přechod posteriorních genů HoxD z proximální do distální fáze během vývoje končetin (Obr.11). Přímé důkazy kromě vazebných míst transkripčních faktorů SMAD, které jsou efektoři signálních drah Tgf- β , však zatím chybí (Mallo, 2018). V každém případě jsou podobnosti mezi vývojem ocasu a párových končetin příliš výrazné na to, aby bylo možné vyloučit jejich vzájemnou souvislost.



Obr.10. A. Schéma somitogeneze Amniota postupnou diferenciací presomitického mezodermu (PSM). Na posteriorním konci tělní osy je v primitivním proužku generován PSM. Zároveň je posteriorně PSM udržován b nediferencovaném stavu působením signálního faktoru Fgf8, který je anteriorněji reprimován gradientem kyseliny retinové (RA). Na úrovni, kde intenzita Fgf8 klesá pod určitou prahovou hodnotu (**differentiation front**), diferencuje PSM v somity. **B.** schéma interakcí signálů regulujících somity. (Dorey, K., & Amaya, E., 2010).

Obr.11. Schéma hypotézy, podle níž při přechodu trupu v ocas působí obdobné mechanismy regulace genů Hox jako v případě párových končetin. Změnu v TAD v této koncepci spustí signální faktor Gdf11, který zároveň reprimuje faktor Oct4. Geny Hoxd1, Hoxd3 a Hoxd4 nejsou během vývoje končetiny Tetrapoda exprimovány (2.2). Nacházejí se však v téže oblasti genomu (Mallo, 2018).



3.3. Vnější genitálie Amniota a jiné deriváty kloakální oblasti.

Vnější genitálie obratlovců skupiny Amniota se podobně jako párové končetiny zakládají v podobě nediferencovaných mezenchymálních vyboulenin, které se v tomto případě označují jako kloakální řasy a nacházejí se na anteriorní straně urogenitální membrány. Kloakální řasy posléze srůstají v nepárový mediální genitální hrbolek (*tuberculum genitale*, *genital tubercle*, GT). Urogenitální membrána vzniká spolu s posteriornější anální membránou rozdělením kloakální membrány expanzí *septum urogenitale*, a je tudíž entodermálního původu. GT na ventrální straně pokrývá uretrální epitel vychlípené urogenitální membrány (uretrální ploténka, *urethral epithelium*, UE) a na dorzální straně epitel, který je ektodermálního původu. Uretrální ploténka sekretuje směrem do mezenchymu signální protein Shh (Perriton, 2002). V případě savců se laterální okraje UE spojují za vzniku močové trubice (*urethra*). Distální část uretrálního

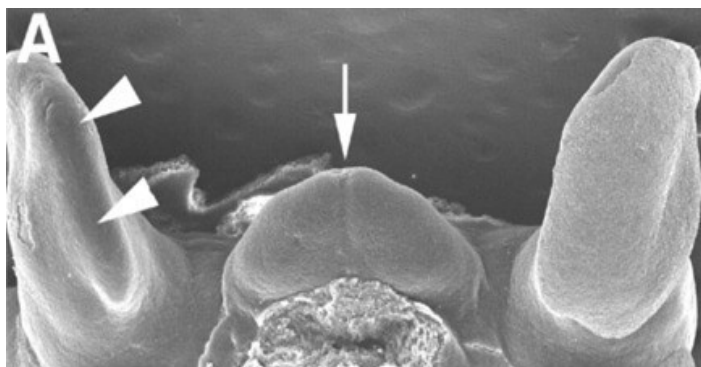
epitelu (*distal urethral epithelium*, dUE) sekretuje faktory Fgf8, Fgf9 a Bmp7 (Yamada et al., 2006). V mezenchymu vyplňujícím GT je po obou stranách uretrální ploténky sekretován protein Fgf10, který je podobně jako v končetině pozitivně regulován signalizací Shh (Haraguchi, 2001). Distální mezenchymu v blízkosti DUE exprimuje faktory *Bmp4* a *Wnt5a* (Yamada et al., 2006). Situace, kterou nalézáme u savců, zřejmě představuje evolučně odvozený stav vzhledem k ostatním skupinám Amniota, u nichž uretrální ploténka tvoří i v plné dospělosti pouze otevřený žlábek *sulcus spermaticus*. (Sanger, 2015)

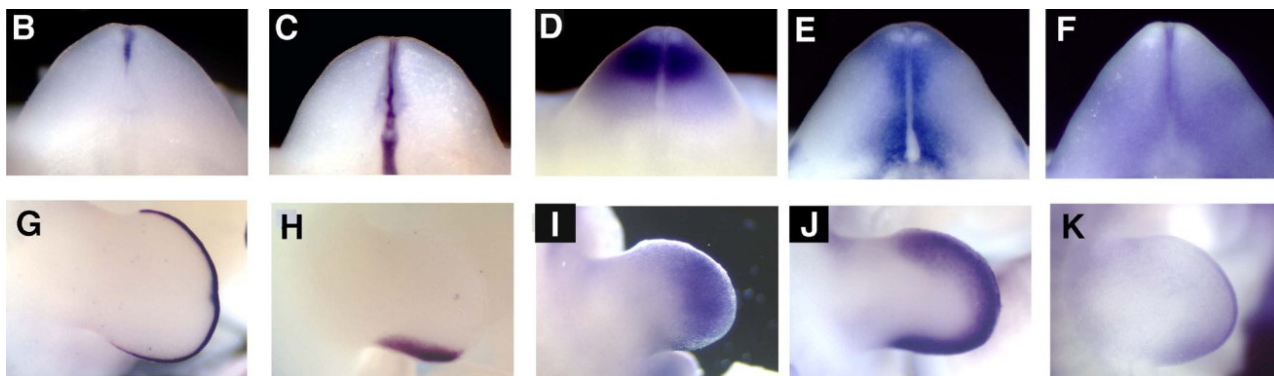
3.3.1 Vztah párových končetin a genitálního hrbolku

Genitální hrbolky lze dávat do souvislosti s párovými končetinami z několika důvodů. Jak u končetin, tak u GT dochází k epiteliálně-mezenchymální tranzici (Dollé, 1991; Kurzrock, 1999) za přítomnosti transkripčních faktorů rodiny Tbx. (Gros & Tabin, 2014). V případě končetin jimi jsou Tbx4 a Tbx5 a v případě genitálního hrbolku se jedná o Tbx2, Tbx3 a Tbx4 (Cohn, 2011). Na EMT generující materiál v genitálním hrbolku se navíc může z části podílet ventrální ektodermová lišta (VER) vnikající ohybem primitivního proužku (Yamada, 2006). Gen *Tbx4* je exprimován v základech zadních končetin i genitálií a v obou strukturách je řízen týměž regulačním elementem označovaným jako HLEB (2.4.1). Společná regulace iniciace zadního páru končetin a genitálního hrbolku je očekávatelná i na základě toho, že se zadní končetiny i kloakální oblast zakládají pod vlivem signálního faktoru Gdf11 aktivujícího posteriorní geny *Hox9-13* (2.2.2).

Po iniciaci následuje fáze distálního vyrůstání regulovaná dvěma signalizačními centry, kterými jsou v případě párových končetin AER sekretující signální proteiny rodiny Fgf a ZPA sekretující signální protein Shh. Při vývoji genitálního hrbolku je Shh sekretován epitelem uretrální ploténky entodermálního původu (UE), zatímco proteiny rodiny Fgf jsou sekretovány oblastí označovanou jako distální uretrální epitel (DUE) (Cobb, 2005). Po vzoru transplantačních experimentů provedených na končetině, při nichž byla přenesena ZPA z posteriorní na anteriorní stranu (Obr.4), byla provedena i transplantace tkání genitálního hrbolku do anteriorního mezenchymu základu končetiny. Pouze implantát obsahující uretrální epitel způsobil ztrátu anteroposteriorní asymetrie provázenou duplikací posteriorních struktur podobně jako je tomu v situaci, kdy je na toto místo transplantována ZPA. (Riddle, 1993; Perriton et al., 2002). I v tomto kontextu však podstupuje transplantovaný epitel tubulární morfogenezi (Perriton et al., 2002).

Obr.12. A: Skenovací elektronová mikrofotografie kloakální oblasti embrya *Mus musculus* ve stádiu E12.0, šipkami je označena apikální ektodermová lišta (AER) zadních končetin a distální část uretrální ploténky (DUE). **B-F:** vizualizace transkripční aktivity vybraných genů v genitálním hrbolku ve stádiu E12.5 metodou *in situ* hybridizace mRNA. **G-K:** Expresce těchto genů v základech zadních končetin ve stádiu E10.5. **B,G:** *Fgf8*. **C,H:** *Shh*, **D,I:** *Wnt5a*. **E,J:** *Bmp4* **F,K:** *Bmp7*. Upraveno podle (Yamada et al., 2006)





V nepřítomnosti Shh dochází k agenezi GT a vývoj se zastavuje na úrovni kloakálních řas (**Perriton, 2002**). Ke kompletní agenezi všech vnějších genitálních struktur však dochází v nepřítomnosti aktivity faktoru Wnt5a (**Seifert, 2009; Cohn, 2011**), který je nezbytný i pro normální vývoj savčí končetiny (**Yamaguchi, 1999**).

Experimentální inhibice signalizace Shh má podobně jako při vývoji končetiny za následek nárůst intenzity signalizace Bmp a pokles exprese *Fgf8* v DUE. Zároveň je v genitálním hrbolku exprimován Noggin, kompetiční inhibitor receptorů dráhy Bmp, který zřejmě plní funkci analogickou roli Grem1 v případě párových končetin (2.3). Shh se v genitálním hrbolku stejně jako v končetině, snad pomocí centromerických regulačních elementů (2.5.3), podílí na aktivaci exprese posteriorních genů *Hoxa13* a *Hoxd13*, které jsou esenciální jak pro specifikaci autopodia, tak distálních částí vnějších genitálií, přičemž delece *Hoxd13* vede ke kompletní agenezi obou struktur (Kondo, 1997; Lin, 2005).

Tyto výsledky poukazují na obdobný mechanismus zajišťujícího terminaci obou struktur, při němž funguje pozitivní zpětná vazba mezi signálními faktory Shh a *Fgf8*, která je po dosažení určitého stupně vývoje přerušena vychýlením rovnováhy mezi vůči *Fgf8* antagonistickou signalizací Bmp a jejími inaktivátory, Nogginem v případě genitálního hrbolku a Grem1 v případě končetin. Faktory Bmp v genitálním hrbolku reprimují *Fgf8* prostřednictvím represe jeho aktivátoru Wnt5a, který sice je exprimován během vývoje končetin, ale zřejmě neplní stejnou funkci jako v končetině (Lin, 2009).

U myši s deletovaným genem *Bmpr1a*, který kóduje receptor signální dráhy Bmp, rovněž dochází k prodlevě v terminaci GT a hyperplázii následkem potlačení apoptózy na jeho distálním konci. U jedinců s deletovaným genem pro Noggin, který slouží jako extracelulární inhibitor dráhy BMP, byla pozorována naopak hypoplázie. V obou případech byl zároveň pozorován pokles v expresi *Fgf8* (Suzuki, 2003), čímž bylo dosaženo podobných výsledků jako v situaci, kdy byly analogickým způsobem manipulovány tytéž signální dráhy během vývoje párových končetin (2.3).

K situace, která byla experimentálně navozena u myši mohlo dojít během evoluce ptáků. V rámci amniot došlo k sekundární redukci falu nezávisle u hrabavých (Galliformes), celé skupiny Neoaves (Brennan, 2008), čeledi hateriovitých (Sphenodontidae) (Sanger, 2015) a všech Squamata, u nichž funkci kopulačního orgánu nahradily apomorfní hemipenisy, zatímco struktury homologické s GT jsou redukované a tvoří strukturu označovanou jako *anterior cloacal lip* (Leal & Cohn, 2014; Gredler, 2014). Kopulační orgán se

u ptáků (Aves) vyvíjí pouze u příslušníků bazálního taxonu Galloanserae, přičemž se u většiny Galliformes tato struktura vyvíjí pouze rudimentálně. Plně vyvinutý penis se vyskytuje jen u řádu vrubozobých (Anseriformes) a čeledi hokovitých (Cracidae) uvnitř Galliformes, u nichž lze předpokládat druhotnou regresi ke stavu, který je pro Galloanserae pleziomorfní (Prum, 2015). Při srovnávacích experimentech na embryích aligátora, emu, kura a kachny, byla u kura (Galliformes) demonstrována exprese signálního faktoru Bmp4 na distálním konci genitálního hrbolku v ranějším stádiu než u zbylých studovaných skupin. Vnesení implantátu uvolňujícího Noggin mělo podobně jako u myši za následek lokální inhibici apoptózy a pokračující vyrůstání orgánu spojené s vymizením mRNA genu *Msx2* (Herrera, 2013), jehož transkripce je řízena signalizací Bmp (Pignatti, 2014).

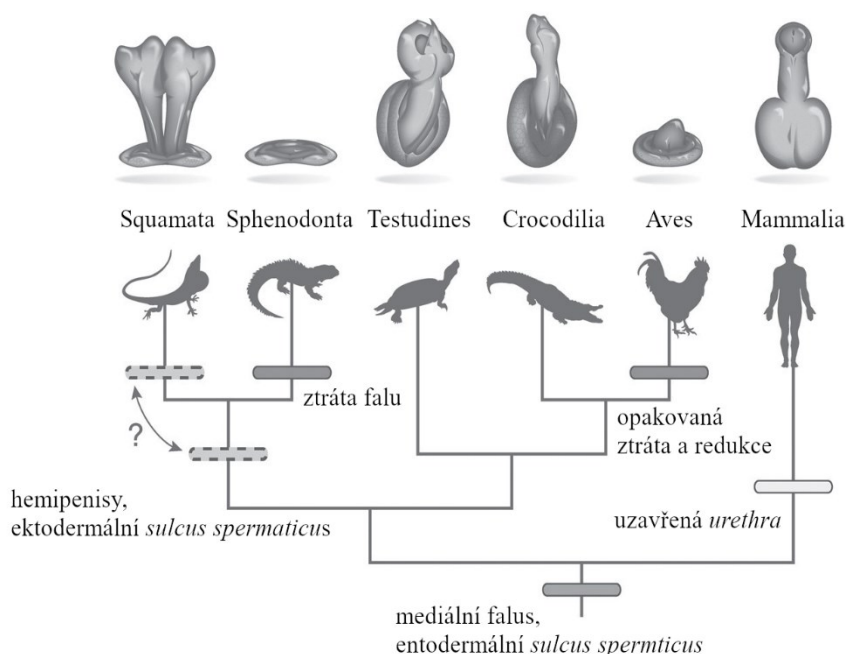
Na základě exprese genů sad HoxA a HoxD je možné považovat vnější genitálie a párové končetiny za homologické struktury. Sada HoxD je přitom v autopodiu a ve vnějších genitáliích regulována některými společnými *cis*-regulačními elementy uvnitř stejné TAD. Konkrétně mezi ně patří elementy CsB a *Prox*. Na aktivaci genů HoxD v genitálním hrbolku se však podílejí i specifické regulační elementy GT1 a GT2. Element Island II-1 je naopak specifický pro končetinu. V případě HoxA je pozorována obdobná situace, při níž vykazuje specifickou aktivitu v genitálním hrbolku sekvence označovaná jako Gte2, zatímco sekvence e16 je specifická pro autopodium a Gte5 je aktivní v obou strukturách (Lonfat, 2014). Již existující TAD tudíž mohou sloužit jako genomové niky (*niches*), uvnitř nichž mohou sekvence získávat funkci *cis*-regulačních elementů, čímž v evoluci vzniká regulační celek s pleiotropním efektem. (Darbellay, 2016).

3.3.2 Hemipenisy Squamata

Coby hlavní kopulační orgán slouží u Squamata párové hemipenisy, které nejsou homologické s deriváty genitálního hrbolku ostatních skupin Amniota, neboť nevznikají z kloakálních řas (*cloacal swellings*), ale z hemipeniálních řas (*hemipenial swellings*, *posterior cloacal swellings*), které se zakládají laterálně až kaudálně od kloakální membrány. Každým z obou hemipenes prochází trubice *ductus spermaticus* vzniklá uzavíráním výlučně ektodermálního *sulcus spermaticus*, které je na rozdíl od uzavírání uretrální ploténky nezávislé na signalizaci Shh (Leal & Cohn, 2014; Gredler et al., 2014). Kloakální i hemipeniální řasy Squamata však exprimují distální geny *Hoxd13* a *Hoxa13*, jejichž mechanismy transkripční regulace byly pravděpodobně kooptovány nezávisle na strukturách vznikajících z GT. Distální část vyvíjejícího se hemipenisu exprimuje ve shodě s GT a končetinami *Bmp4* a *Wnt5a*, zatímco *Fgf8* chybí (Gredler et al., 2014). Proximálnější část orgánu exprimuje transkripční faktor *Tbx4*, který je regulován týměž regulačním elementem HLEB v hemipenisech (Infante, 2015), genitálním hrbolku a zadních končetinách (Menke, 2015), přestože genitální hrbolky a hemipenisy Squamata nejsou homologickými strukturami (Gredler et al., 2014). HLEB zůstává díky své roli ve vývoji genitálií konzervovaný i u fylogeneticky odvozených skupin hadů, jejichž zástupci končetiny zcela ztratili. Delece HLEB u savců má za následek defektní vývoj zadních končetin i GT (Infante, 2015).

V případě hadů je pozoruhodné, že mnohé regulační mechanismy, které fungují při vývoji párových končetin, zůstaly zachovány, přestože u této skupiny se končetiny ani genitální hrbolky plně nevyvíjejí.

K oběma fázím bimodální exprese genů *HoxD* dochází jak v případě myši, u nichž byla narušena funkce buď ZRS (Sagai et al., 2005) nebo samotné kódující sekvence genu *Shh* (Chiang et al., 2001; Kraus, 2001), tak u hadů, v jejichž případě je degradace ZRS pravděpodobnou příčinou předčasného zastavení růstu zadních končetin (Leal & Cohn, 2016). Právě přítomnost autopodiální fáze exprese *HoxD* může být dokladem neoddělitelného spřažení regulace exprese genů *HoxD* a *HoxA* v základech končetin a vnějších genitálií a je možným vysvětlením přítomnosti pánevních rudimentů u bazálních hadů čeledi Pythonidae a Boidae (Leal & Cohn, 2016). V tomto kontextu je třeba připomenout, že pouhá iniciace končetin nevyžaduje aktivitu *Shh* ani *Fgf8* (2.1). Degradace sekvence ZRS u hadů s redukovánými nebo zcela chybějícími končetinami je tudíž ve shodě s absencí exprese faktoru *Shh* ve vyvíjejících se hemipenisech, neboť jeho aktivita již není nutná pro vznik žádných adaptivních struktur (Leal & Cohn, 2016; Leal & Cohn, 2014; Gredler et al., 2014; Kvon et al., 2016).



Obr.13. Změny v anatomii samčích vnějších genitálií ve fylogenezi Amniota. V případě Sphenodonta není jasné, jaký stav byl u této skupiny pleziomorfní. (upraveno podle Sanger, 2015)

3.3.3 Kloakální výběžek Actinopterygii a deriváty posteriorní trávicí trubice

Během embryonálního vývoje vzniká u některých zástupců Actinopterygii kloakální výběžek označovaný jako *vent*. *Vent* veslonose amerického (*Polyodon spathula*) je jedinou dosud známou vnější strukturou ve které geny *HoxA* podléhají reverzně kolineární regulaci. Oblast *Hoxa11* je vnořena uvnitř oblasti *Hoxa13*, což je možné proto, že *Hoxa11* Actinopterygii není na rozdíl od *Hoxa11* Tetrapoda reprimován aktivitou *Hoxa13* (2.5.2). K tomuto uspořádání dochází i v posteriorním oddílu střeva *Danio rerio*, ze kterého je *vent* odvozený. *Vent* druhu *Lythrypnus dalli*

z čeledi *Gobiidae* rovněž exprimuje *Hoxd13a* a *Hoxa11a* v reverzně kolineárním pořadí. (Archambeault, 2014). Posteriorní geny *Hoxd12* a *Hoxd13* jsou spolu s *Shh* exprimovány také v kloakální oblasti Chondrichthyes (*Scyliorhinus canicula*), kde ale nedochází ke vzniku vnějších struktur (Freitas, 2007). Podobná situace byla pozorována i v případě zástupců Teleostei, u kterých se vnější struktury nevytvářejí. V kloakální oblasti *Danio rerio* jsou přítomny *Hoxd13* a *Hoxd12* a u *Oryzias latipes* tatáž oblast sekretuje také *Shh* (Kobayashi, 2006).

Geny *Hoxd13* a *Hoxa13* mají zásadní úlohu i ve vývoji zadního střeva Amniota (*caudal intestinal portal*), a jeho derivátů. *Hoxd13* a *Hoxd12* jsou nezbytné i pro normální vývoj hladké svaloviny řitního svěrače savců (Kondo et al., 1996) a případě ptáků bylo demonstrováno, že jsou, podobně jako během vývoje autopodia, aktivovány signalizací *Shh*. Nadto byly provedeny experimenty replikující transplantaci ZPA na anteriorní stranu končetiny (Obr.4), při nichž došlo ke shodné zrcadlové duplikaci následkem vnesení entodermálního epitelu zadního střeva do mezenchymu končetinového základu. (Roberts, 1995). Expresí genů *Hoxa13* a *Hoxb13* je, jak bylo později prokázáno (2.5.3), udržována signalizací *Shh* skrze regulační element CsB, který se vyskytuje jak v genomu Tetrapoda, tak Teleostei. Regulační evoluce *Shh* však zřejmě probíhala v každé z linií odděleně, neboť entodermální regulační element MACS1 není přítomný v genomu Teleostei (Sagai et al., 2009; Lin, 2013).

Je proto možné, že jako základ pro vývoj kloakálních výběžků posloužil genový regulační mechanismus, který byl kooptován z párových ploutví do kontextu kloakální oblasti. Jako alternativní možnost byla rovněž představena hypotéza, podle níž je posteriorní oddíl střeva evolučně nejpůvodnější doménou exprese posteriorních genů Hox homologických genu *Abd-B*, který je exprimován v posteriorní oblasti trávicí trubice ostatních kmenů Bilateria (Kondo et al., 1996).

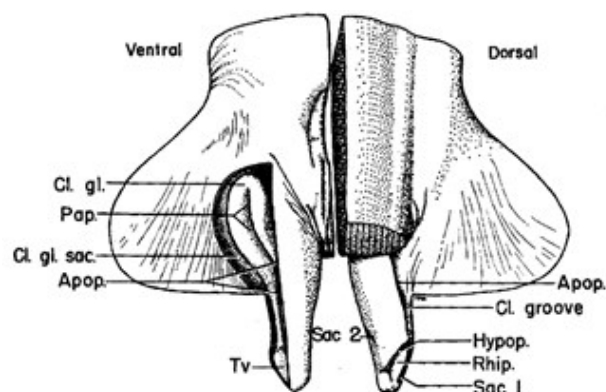
3.4. Kopulační výrůstky a hlavové laloky Chondrichthyes

Fylogeneticky nejstarší formu pářícího orgánu obratlovců (O'Shaughnessy et al., 2015) představují kopulační výrůstky zadních ploutví (*claspers*) vyskytující se u samců recentích paryb (Chondrichthyes) a fosilní skupiny Placodermi (Long et al., 2014; Ahlber et al., 2009). Claspers fungují jako orgány zprostředkující vnitřní oplození přenosem spermatických buněk z kloaky samce do kloaky samice. Na ventrální straně výběžků se táhne žlábek (*clasper groove*), do kterého je přiváděn proximálním vývodem (*apophyle*) prekurzor seminální kapaliny. Ze žlábků je po smísení se sekrety pohlavních žláz (*clasper glands*) vypouštěna už hotová inseminační kapalina distálním otvorem (*hypophyle*).

U rejnoka bodlinatého (*Leucoraja erinacea*) *claspers* vznikají prodloužením myxopterygia o tři chrupavčité kosterní elementy, které shodně s ostatními chrupavčitými strukturami v těle kondenzují za působení transkripčního faktoru Sox9 (O'Shaughnessy et al., 2015). Tento proces je doprovázen přetrvávající expresí genů *Hand2*, *Shh*, *Fgf8*, *Grem1* a *Hoxd13*, v posteriorní části zadní ploutve samců ve stádiu, kdy u samic už není registrovatelná. Pokračující průběh končetinového vývojového programu je podmíněn signalizací zprostředkovanou pro samce specifickým androgenním receptorem (AR), který je lokalizován v jádře a působí jako transkripční faktor vázající se na sekvence ARE (*androgen receptor response element*)

(O'Shaughnessy et al., 2015). V genomu řady příslušníků Chondrichthyes se nacházejí dva cis-regulační elementy tohoto typu, *Hand2*-ARE1 a *Hand2*-ARE2, regulující transkripční faktor *Hand2* zodpovědný za indukci a posteriorní lokalizaci ZPA v raném základu párových ploutví (2.3). Podle této interpretace se při vývoji *claspers* rekapituluje vývoj končetiny díky nově nabytému pohlavně specifickému regulačnímu elementu řídícímu expresi *Hand2* na již vzniklé ploutvi, při jejímž zakládání už *Hand2* svou roli jednou sehrál. (O'Shaughnessy et al., 2015). Kolineární exprese *Hoxd13* a *Hoxd12* byla zjištěna i ve vyrůstajících kopulačních orgánech příslušníka řádu Selachimorpha máčky skvrnitě (*Scyliorhinus canicula*) (Freitas, 2007), což poukazuje na to, že výše popsany mechanismus může být společný všem Chondrichthyes.

Obr.14. Anatomie kopulačních výrůstků samce rejnoka *Urolophus jamaicensis*, z dorzální a ventrální strany, **apop.** – apopyle (vstupní otvor), **cl.gl.**, clasper gland (žláza sekretující složky seminální kapaliny), **hypop.** – hypopyle (distální vývod), **pap.** – papily žlázy, **t.v.** – terminální chrupavka. Upraveno podle (LaMarca, 1964).



Příslušníci čeledi Myliobatidae (mantovití) jsou vedle kopulačních výrůstků opatřeni též hlavovými laloky odvozenými z prsních ploutví, které u této skupiny srůstají s hlavou.

Při vývoji hlavových laloků také dochází k expresi transkripčních faktorů *Hand2* a *Hoxd13* spolu se signálními proteiny *Shh*, *Fgf8* a jaderným androgenním receptorem (Swenson et al., 2018). Obzvláště společná exprese androgenního receptoru a *Hand2* může poukazovat na možnou kooperaci vývojového programu, který se uplatňuje při vývoji kopulačních výrůstků na pánevních ploutvích téže skupiny (Swenson et al., 2018).

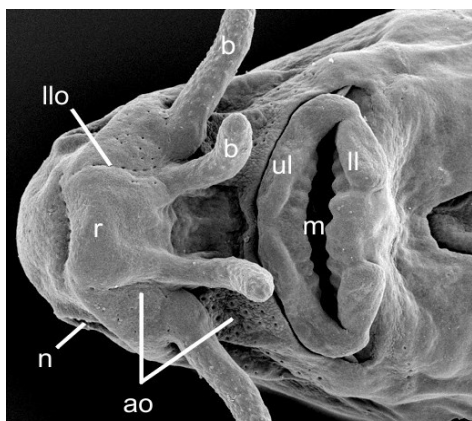
V evoluci Chondrichthyes tak pravděpodobně došlo ke dvojí kooperaci genetických mechanismů instruujících vývoj párových ploutví. V prvním kroku se tento mechanismus zopakoval na již vzniklých ploutvích pánevního páru samců následkem apomorfní regulace genu *Hand2* pod vlivem androgenního receptoru. U Myliobatidae pak byl již ustanovený program použit pro vývoj anteriorně umístěných laloků prsních ploutví. Na příkladě *claspers* lze rovněž demonstrovat evoluci pohlavně dimorfických znaků, které jsou v tomto případě výsledkem získání jediného cis-regulačního elementu s pohlavně specifickou aktivitou, který tak plní funkci uzlu (*node*) genové regulační sítě (Peter & Davidson, 2011).

3.5. Vousky paprskoploutvých ryb

Ve skupině paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) jsou vousky značně variabilní co do umístění a počtu (Fox, 1999). U příslušníka Chondrostei, bazální skupiny Actinopterygii, veslonose amerického (*Polyodon spathula*) dochází při vývoji rostrálních vousků (*barberls*), které se zakládají jako deriváty mandibulárního

žaberního oblouku, k inverzně kolineární expresi autopodiálních genů *Hoxd13* a *Hoxd12*, přičemž doména exprese *Hoxd12* je vnořena uvnitř domény *Hoxd13*. Mandibulární oblouk je jinak standardně považován za oblast bez exprese genů Hox (Archambeault et al., 2014) (2.2.1). V případě modelového zástupce *Danio rerio* se tvoří dva páry: maxilární a nasální. Na rozdíl od vousek veslonose však není při vývoji ani jednoho z párů registrovatelná exprese žádných genů Hox (Archambeault et al., 2014).

U sumce amurského (*Silurus asotus*) se tvoří maxilární a mandibulární pár vousek, na jejichž vývoji se podílí signalizace Shh a Fgf8, přičemž inhibice jednoho ze signálů vede k poklesu intenzity druhého (Itoyama, 2019), což může poukazovat na přítomnost podobného mechanismu zpětné vazby jako v případě párových ploutví (2.3). Vzájemná regulace signalizačních drah Fgf a Shh nespojuje vousek pouze s výrazně komplexnějšími párovými končetinami, ale také s kožními deriváty a obecně se strukturami vznikajícími za působení epiteliálně-mezenchymálních interakcí (Mikkola, 2007).



Obr.15. Skenovací elektronová mikrofotografie rostrální oblasti jesetera malého (*Acipenser ruthenus*), příslušníka téže čeledi jako veslonos americký (*Polyodon spathula*). **b:** rostrální vousek (*barbels*), **r:** rostrum, **n:** nozdra, **ao:** ampulární orgán, **m:** ústní otvor (*mouth*), **ul:** horní pysk (*upper lip*), **ll:** spodní pysk (*lower lip*), **llo:** orgány postranní čáry (*lateral line organs*). (Minařík, 2017)

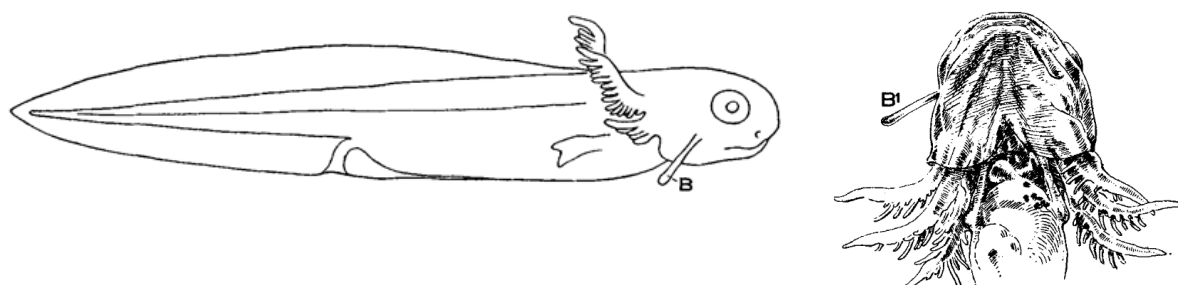
3.6. Deriváty faryngeálního aparátu

Charakteristickým znakem skupiny Deuterostomia je žaberní aparát tvořený žaberními štěrbinami. U Chordata je prostor mezi štěrbinami vystužen chrupavčitými faryngeálními oblouky, z jejichž prvního, mandibulárního, páru vznikají u Gnathostomata čelisti. Druhý faryngeální oblouk se označuje jako hyoidní. Ve skupině Osteognathostomata vytváří hyoidní oblouk mimo jiné operkulum (skřele) překrývající posteriornější žaberní štěrbinu. Ve skupině Tetrapoda srůstá během embryonálního vývoje, případně metamorfózy, hyoidní operkulum s krkem, čímž permanentně uzavírá žaberní výchlipky (Richardson, 2012). V larválních stádiích obojživelníků však operkulum nesrůstá docela, nýbrž umožňuje průchod vodě filtrované žaberním aparátem. V případě žab (*Anura*) zůstává v operkulu otvor (spirakulum), zatímco u ocasatých (*Caudata*) operkulum posteriorní žaberní oblouky nepřerůstá. U obou skupin vznikají vnější žábry, které jsou ovšem u žab zcela překryty operkulem.

Mezi recentními obratlovci se vnější žábry vyskytují nejen na volně žijících larválních stádiích ocasatých obojživelníků a žab, ale také u Dipnoi a čeledi Polypteridae náležící mezi Actinopterygii. V případě *Caudata* vznikají na prvních třech branchiálních obloucích větve (*rami*) nesoucí žaberní filamenta. V případě bahníka amerického (*Lepidosiren paradoxa*) a bahníka afrického (*Protopterus annectens*) se nacházejí na prvních čtyřech branchiálních obloucích. U zástupce Actinopterygii (*Polypterus senegalus*) vznikají vnější žábry z hyoidního oblouku. (Štundl, 2019)

U Chondrichthyes se na kosterních elementech žaberních oblouků nalézají struktury označované jako žaberní paprsky (*branchial rays*), jejichž vývoj sdílí s párovými končetinami některé zásadní regulační mechanismy.

Při experimentech, kdy byla inhibována signalizace Shh, byla pozorována ztráta polarizace podobná výsledkům transplantace ZPA končetiny Tetrapoda (Obr.4). Bylo tak demonstrováno, že pro vyrůstání a polarizaci žaberního paprsku podél anteroposteriorní osy je podobně jako v případě končetiny nutná posteriorně lokalizovaná signalizační aktivita proteinu Shh (Gillis, 2011). Vývoji samotných paprsků předchází tvorba epiteliální ztlustěliny podobné AER označované jako epiteliální lišta žaberního oblouku (*gill arch epithelial ridge*, GAER). GAER sekretuje shodně s AER signální protein Fgf8, který i v tomto případě interaguje s Shh v rámci pozitivní zpětné vazby (2.3) (Gillis et al., 2009). Signalizace Shh rovněž pohání posteriorní expanzi hyoidního oblouku za vzniku operkula, a to jak u Holocephali, tak Amniota (Richardson, 2012; Gillis, 2011).

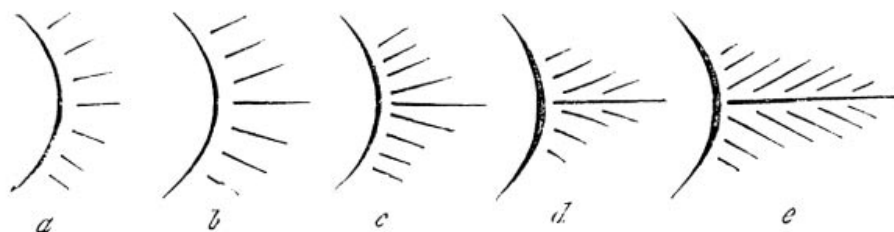


Obr.16. Vlevo: Larva axolotla skvrnitého (*Ambystoma punctatum*, syn. *maculatum*) ve stádiu 43. Písmeno B označuje balancer. V tomto stádiu jsou také plně vyvinuty vnější žábry, **vpravo:** balancer **B1** vzniklý po transplantaci ektodermu z jedince druhu *Ambystoma punctatum* do téže oblasti jedince *Ambystoma tigrinum*. (Harrison, 1925)

Vedle vnějších žaber přechodně vznikají na mandibulárním oblouku v larválních stádiích některých zástupců ocasatých obojživelníků z čeledi *Ambystomidae*, *Salamandridae* a *Hynobidae* tyčinkovité přívěsky označované jako *balancers*, na jejichž koncích se nacházejí přichytné orgány (Fox, 1999)

Za účelem zjištění lokalizace faktorů určujících vývoj balanceru byly provedeny experimenty, během nichž byl balancer indukován transplantací ektodermu druhu *Ambystoma punctatum* na téže místo u druhu *Ambystoma tigrinum* (Harrison, 1925). Balancer exprimuje geny *Otx5* a *Otx4* (Sauka-Spengler et al., 2002). Souvislost balancerů a vnějších žaber s párovými končetinami nelze pro nedostatek poznatků o vývoji obou struktur blíže vyhodnocovat. Na příkladě vousků veslonose (*Polyodon spathula*) však bylo demonstrováno že se v mandibulární oblasti mohou tvořit struktury sdílející regulační mechanismy s párovými končetinami. Na základě blízkosti prsního pletence byla jako alternativa modelu ploutevního lemu formulována teorie, podle níž vznikly párové ploutve modifikací nejposteriornějšího žaberního oblouku (Gegenbaur, 1878). Tato teorie byla pro nedostatek fosilních a embryologických důkazů považována za méně pravděpodobnou

než teorie ploutevních lemů. Podobný mechanismus pohánějící distální růst základu končetiny a posteriorní expanzi faryngeálních oblouků a role Shh v procesu polarizace žaberních paprsků ale svědčí o možné spojitosti těchto struktur. Stále je tedy možné, že párové končetiny Gnathostomata jsou kompozitní strukturou, která má původ jak v somatopleure, tak v žaberních obloucích. (Diogo, 2020)



Obr.17: Archipterigiální hypotéza vysvětlující původ prsních pletenců jako modifikací žaberních oblouků (Coates, 2003 podle Gegenbaur, 1878).

4. Závěr

Závěrem lze konstatovat, že existují sdílené mechanismy regulují vyrůstání řady tělních extremit obratlovců (Lin et al., 2013; Diogo, 2020), které jsou společně přítomny v párových končetinách Tetrapoda. Jedná se především o vzájemnou interakci signálních faktorů Shh a Fgf, interakci faktorů Wnt a Fgf a kolineární, případě reverzně kolineární, exprese genů *Hox*, zejména sad *HoxD* a *HoxA*. Párové i mediální ploutve rybovitých obratlovců, končetiny Tetrapoda, vnější genitálie Amniota a žaberní paprsky Chondrichthyes jsou instruovány mechanismem zahrnujícím pozitivní zpětnou vazbu mezi Shh a Fgf8. Tyto dva faktory zároveň hrají důležitou roli při vývoji ocasu. Fgf8 vytváří v tělní ose anteriorně klesající gradient, jehož hranice funguje jako diferenční předěl (*wavenfront*), za nímž mezoderm posouvající se z primitivního proužku, resp. blastoporu, vytváří somity. Pravidelnost segmentace somitů je regulována cyklickou expresí transkripčních faktorů *Hes* a částečně závisí na Shh. Podobný mechanismus funguje i v končetinách, kde cyklická exprese paralogů genů *Hes* pod vlivem Shh a Fgf8 reguluje pravidelnost zakládání kosterních elementů (Sheeba et al., 2016).

Ve vícero strukturách byla rovněž popsána epiteliální ztlustění sekretující faktory Fgf8, které pozitivně regulují proliferaci mezenchymu. V případě končetin jí je apikální ektodermová lišta AER, v případě žaberního oblouku se jedná o epiteliální lištu žaberního oblouku GAER a v případě ocasu byla popsána ventrální ektodermová lišta (VER), která vzniká ventrálním ohybem primitivního proužku a může se podílet i na vývoji kloakální oblasti.

S výjimkou žaberních paprsků mají při vývoji všech srovnávaných tělních extremit obratlovců ústřední roli posteriorní geny sad *HoxD* a *HoxA*, které tvoří v rámci genů *Hox* svébytný regulační celek. Tyto geny jsou homologické s jediným genem *Abdominal-B* přítomným v genomu ostatních bilaterálních kmenů a jsou typicky exprimovány ve vnořených doménách. Zároveň je pro ně charakteristický způsob regulace nezávislý na anteriornějších genech *Hox*. V posteriorní oblasti těla obratlovců tvoří na základě exprese

posteriočních genů *HoxA* a *HoxD* zadní končetiny, ocas a zřejmě i vnější genitálie společný regulační modul podřízený signalizací Gdf11, čímž dochází k jakémusi větvení, případně duplikaci, tělní osy.

Vznik vedlejších os těla může souviset právě se vznikem globální regulace celých sad genů Hox, která se v plné podobě nevyskytuje u žádných jiných skupin Bilateria. V souladu s tím se u fylogeneticky nejbližší skupiny Cyclostomata nevyskytují ani párové končetiny ani vnější genitálie. Z tohoto hlediska je pozoruhodné, že pro vývoj autopodia a vnějších genitálií nejsou nezbytné všechny geny sad HoxD a HoxA, ale přesto jsou v jejich primordiích exprimované i fyzicky blízké geny, které jsou zřejmě neoddělitelně podřízeny téže globální regulaci jako geny sousední a jejich exprese je tudíž nevyhnutelná, což lze interpretovat jako endogenní omezení (*constraints*), dané kompaktní strukturou sady *HoxD* na molekulární úrovni (Darbellay & Duboule, 2016).

Analýza vývojové regulace žaberních oblouků Chondrichthyes dále přispěla k diskusi ohledně původu párových končetin, neboť se ukázalo, že při vývoji jejich derivátů v podobě tzv. žaberních paprsků funguje v základních rysech podobný mechanismus polarizace a vyrůstání jako v párových ploutvích, resp. končetinách, čímž byly podány první vývojově genetické důkazy ve prospěch teorie archipterygiální teorie původu ploutví.

Rovněž se ukazuje, že nutnou preadaptací ke vzniku párových ploutví byla nejen kompartmentalizace somatopleury (2.4.1), ale také její kontakt s ektodermem, který je během vývoje recentních Cyclostomata oddělen od somatopleury expandujícím paraxiálním mezodermem. Na základě tohoto pozorování byl formulován model kombinující obě teorie, podle něhož se perzistentní somatopleura těsně pod ektodermem objevila poprvé právě v branchiální oblasti, ve které se vlivem signalizace ze srdečního základu vyvinuly prekuzory prsních ploutví. Tyto struktury mohly dále expandovat kaudálně způsobem podobajícím se laterálním ploutevním lemům, čímž daly vzniknout zadnímu páru ploutví (Tulenko et al., 2013).

Povaha evoluce genových regulací připouští kombinace již etablovaných vývojových systémů a genových regulačních sítí v jedné struktuře. Proto existuje možnost, že jak teorie ploutevních lemů, tak archipterygiální teorie může být v jistém smyslu relevantní pro popis evoluce párových ploutví u předků Gnathostomata.

Společné mechanismy vývoje tělních extremit však mohly dokonce předcházet vzniku Gnathostomata. Nedávné experimenty provedené způsobem replikujícím transplantaci ZPA totiž prokázaly přítomnost obdobného polarizačního mechanismu i v ramenech Cephalopoda (Tarazona et al., 2019). Část genetického programu regulujícího vyrůstání a polarizaci tělních extremit obratlovců tak může být společný všem Bilateria.

Zrovna tak nemusejí být mechanismy vzniku metamerismu a obecně repetitivních anatomických struktur společné pouze párovým končetinám a tělní ose obratlovců, ale může se jednat o společný znak všech článkovaných skupin Bilateria, čehož je dokladem exprese elementů signální dráhy Notch, která se zdá být univerzálním prvkem všech segmentačních procesů v rámci bilaterálních kmenů. (Liao & Oates, 2017)

Studium evolučních a vývojových mechanismů končetin a souvisejících anatomických struktur tak může přispět nejen k rekonstrukci chybějících článků ve fosilním záznamu, ale také může pomoci odhalit obecné mechanismy, pomocí nichž je informace uložená v DNA realizována v podobě těla.

Literatura

- Acemel, R. D. et al. 2016.** A single three-dimensional chromatin compartment in amphioxus indicates a stepwise evolution of vertebrate Hox bimodal regulation. *Nature Genetics* 48(3): 336–341.
- Adachi, N. et al. 2016.** Regulatory Evolution of Tbx5 and the Origin of Paired Appendages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(36): 10115–20.
- Agarwal, P. et al. 2003.** Tbx5 Is Essential for Forelimb Bud Initiation Following Patterning of the Limb Field in the Mouse Embryo. *Development* 130(3): 623–33.
- Ahlberg, P. et al. 2009.** Pelvic claspers confirm chondrichthyan-like internal fertilization in arthrodires. *Nature* 460(7257): 888–889.
- Ahn, D. & Ho, R. K. 2008.** Tri-Phasic Expression of Posterior Hox Genes during Development of Pectoral Fins in Zebrafish: Implications for the Evolution of Vertebrate Paired Appendages. *Developmental Biology* 322(1): 220–33.
- Ahn, D., 2005.** T-Box Gene Tbx5 Is Essential for Formation of the Pectoral Limb Bud. *Nature* 417(6890): 754–58.
- Aires, R. et al. 2019.** Tail Bud Progenitor Activity Relies on a Network Comprising Gdf11, Lin28, and Hox13 Genes. *Developmental Cell*. 48(3): 383-395.e8.
- Aires, R., Dias, A. & Mallo, M. 2018.** Deconstructing the Molecular Mechanisms Shaping the Vertebrate Body Plan. *Current Opinion in Cell Biology* 55: 81–86.
- Allard, P., & Tabin, C. J. 2009.** Achieving bilateral symmetry during vertebrate limb development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20(4): 479–484.
- Altshuler, M., Clarke, J. D. and Tickle, C. 1997.** Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* 124: 4547 – 4556.
- Amemiya, C. T. et al. 2013.** The African Coelacanth Genome Provides Insights into Tetrapod Evolution. *Nature* 496(7445): 311–16.
- Andrey, G. et al. 2013.** A Switch Between Topological Domains Underlies HoxD Genes Collinearity in Mouse Limbs. *Science* 340(6137): 1234167.
- Archambeault, S., Taylor, J. & Crow, K. D. 2014.** HoxA and HoxD Expression in a Variety of Vertebrate Body Plan Features Reveals an Ancient Origin for the Distal Hox Program. *EvoDevo* 5(1): 44.
- Bandyopadhyay, A. et al. 2006.** Genetic Analysis of the Roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in Limb Patterning and Skeletogenesis. *PLoS Genetics* 2(12): e216.
- Beagan, J. A. & Phillips-Cremins, J., E. 2020.** On the Existence and Functionality of Topologically Associating Domains. *Nature Genetics* 52(1): 8–16.
- Beccari, L. et al. 2016.** A Role for HOX13 Proteins in the Regulatory Switch between TADs at the HoxD Locus. *Genes & Development* 30 (10): 1172-86.
- Bénazéraf, B. & Pourquié, O. 2013.** Formation and Segmentation of the Vertebrate Body Axis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29(1): 1–26.
- Berlivet, S. et al. 2013.** Clustering of Tissue-Specific Sub-TADs Accompanies the Regulation of HoxA Genes in Developing Limbs. *PLoS Genetics* 9(12): e1004018.
- Bickley, S. & Logan, M. 2014.** Regulatory Modulation of the T-Box Gene Tbx5 Links Development, Evolution, and Adaptation of the Sternum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(50): 17917–22.
- Bolt, C. C. & Duboule, D. 2020.** The Regulatory Landscapes of Developmental Genes. *Development* 147(3): dev171736.

- Burke, A. C. et al. 1995.** Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 121: 333–346.
- Carroll, S. B. 2005.** Evolution at Two Levels: On Genes and Form. *PLoS Biology* 3(7): e245.
- Coates, M. 2003.** The Evolution of Paired Fins. *Theory in Biosciences*, 122(2-3), 266–287.
- Cobb, J. 2005.** Comparative Analysis of Genes Downstream of the Hoxd Cluster in Developing Digits and External Genitalia. *Development* 132(13): 3055–67.
- Cohn, M. J. et al. 1995.** Fibroblast Growth Factors Induce Additional Limb Development from the Flank of Chick Embryos. *Cell* 80(5): 739–46.
- Cooke, J. & Zeeman, E. C. 1976.** A Clock and Wavefront Model for Control of the Number of Repeated Structures during Animal Morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology* 58(2): 455–76.
- Cunningham, T. J. et al. 2015.** Antagonism between Retinoic Acid and Fibroblast Growth Factor Signaling during Limb Development. *Cell Reports* 3(5): 1503–11.
- Cunningham, T. J. & Duester, G. 2015.** Mechanisms of Retinoic Acid Signalling and Its Roles in Organ and Limb Development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(2): 110–23.
- Darbellay, F. & Duboule, D. 2016.** Topological Domains, Metagenes, and the Emergence of Pleiotropic Regulations at Hox Loci. *Current Topics in Developmental Biology* 116: 299–314.
- Davis, M. C. 2013.** The Deep Homology of the Autopod: Insights from Hox Gene Regulation. *Integrative and Comparative Biology* 53(2): 224–32.
- Davis, M. C., Dahn, R. D. & Shubin, N. H. 2007.** An Autopodial-like Pattern of Hox Expression in the Fins of a Basal Actinopterygian Fish. *Nature* 447(7143): 473–76.
- De Laat, W. & Duboule, D. 2013.** Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscapes. *Nature* 502(7472): 499–506.
- Delpretti, S. 2013.** Multiple Enhancers Regulate Hoxd Genes and the Hotdog LncRNA during Cecum Budding. *Cell Reports* 5(1): 137–50.
- Deschamps, J & van Nes, J. 2005.** Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development* 132: 2931–2942.
- Deschamps, J. 2007.** Ancestral and recently recruited global control of the Hox genes in development. *Current Opinion in Genetics & Development* 17(5): 422–427.
- Diogo, R. 2020.** Cranial or Postcranial—Dual Origin of the Pectoral Appendage of Vertebrates Combining the Fin-fold and Gill-arch Theories? *Developmental Dynamics*, doi: 10.1002/dvdy.192
- Dollé, P. et al. 1991.** HOX-4 Genes and the Morphogenesis of Mammalian Genitalia. *Genes & Development* 5(10): 1767–76.
- Domyan, E. T. et al. 2016.** Molecular shifts in limb identity underlie development of feathered feet in two domestic avian species. *Elife*. 2016;5:e12115. doi:10.7554/eLife.12115.
- Dorey, K. & Amaya, E. 2010.** FGF Signalling: Diverse Roles during Early Vertebrate Embryogenesis. *Development* 137(22): 3731–42.
- Durston, Antony J. 2018.** Two Tier Hox Collinearity Mediates Vertebrate Axial Patterning. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 102.
- Farin, H., F. 2013.** Tbx2 Terminates Shh/Fgf Signaling in the Developing Mouse Limb Bud by Direct Repression of Gremlin1. *PLoS Genetics* 9(4): e1003467.
- Fox, H. 2004.** Barbels and barbel-like tentacular structures in sub-mammalian vertebrates: a review. *Hydrobiologia*, 403: 153–193
- Freitas, R. 2007.** Biphasic Hoxd Gene Expression in Shark Paired Fins Reveals an Ancient Origin of the Distal Limb Domain. *PLoS ONE*, 2(8), e754.
- Freitas, R., Zhang, G. & M. J. Cohn. 2006.** Evidence That Mechanisms of Fin Development Evolved in the Midline of Early Vertebrates. *Nature* 442(7106): 1033–37.
- Fromental-Ramain, C. et al. 1996.** Hoxa-13 and Hoxd-13 Play a Crucial Role in the Patterning of the Limb Autopod. *Development* 122(10): 2997–3011.
- Gehrke, A. R., & Shubin, N. H. 2016.** Cis -regulatory programs in the development and evolution of vertebrate paired appendages. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 57: 31–39.
- Gehrke, A., R. et al. 2015.** Deep Conservation of Wrist and Digit Enhancers in Fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(3): 803–8.

- Gillis, J. A., Dahn, R. D. & Shubin, N. H. 2009.** Shared Developmental Mechanisms Pattern the Vertebrate Gill Arch and Paired Fin Skeletons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(14): 5720–24.
- Gillis, J. A. et al. 2011.** Holocephalan Embryos Provide Evidence for Gill Arch Appendage Reduction and Opercular Evolution in Cartilaginous Fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(4): 1507–12.
- Gillis, A.,J. & Hall, B., K. 2016.** A Shared Role for Sonic Hedgehog Signalling in Patterning Chondrichthyan Gill Arch Appendages and Tetrapod Limbs. *Development* 143(8):1313–17.
- Gillis, J. A., Dahn, R. D. & Shubin, N. H. 2009.** Shared Developmental Mechanisms Pattern the Vertebrate Gill Arch and Paired Fin Skeletons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(14): 5720–24.
- Goldman, D. C. 2000.** Fate and Function of the Ventral Ectodermal Ridge during Mouse Tail Development. *Development* 127(10): 2113–23.
- Gomez, C. 2008.** Control of Segment Number in Vertebrate Embryos. *Nature* 454(7202): 335–39.
- Gonzalez, F., Duboule, D. & Spitz, F. 2007.** Transgenic Analysis of Hoxd Gene Regulation during Digit Development. *Developmental Biology* 306(2): 847–59.
- Gredler, M. L., Sanger, T. J. & Cohn, M.J. 2014.** Development of the Cloaca, Hemipenes, and Hemiclitoris in the Green Anole, *Anolis Carolinensis*. *Sexual Development* 9(1): 21–33.
- Greer, J. M. et al. 2000.** Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution . *Nature* 403(6770): 661–665.
- Grimes, D.T. 2019.** Making and breaking symmetry in development, growth and disease. *Development*, 146: doi: 10.1242/dev.170985.
- Gros, J. & Tabin C. J. 2014.** Vertebrate Limb Bud Formation Is Initiated by Localized Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Science* 343(6176): 1253–56.
- Haraguchi R. et al. 2001.** Unique functions of Sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development*, 128: 4241–4250.
- Harima Y. et al. 2013.** Accelerating the tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the *Hes7* gene. *Cell Reports* 3(1): 1–7.
- Harrison, R. G. 1925.** The development of the balancer in *Amblystoma*, studied by the method of transplantation and in relation to the connective-tissue problem. *Journal Experimental Zoology* 41: 349–427.
- Harvey, S. A. & Logan, M. P. 2006.** *Sall4* acts downstream of *tbx5* and is required for pectoral fin outgrowth. *Development* 133: 1165–1173.
- Hasson, P et al. 2007.** *Tbx5* Is Dispensable for Forelimb Outgrowth. *Development* 134(1): 85–92.
- Chan, Y. F. et al. 2010.** Adaptive Evolution of Pelvic Reduction in Sticklebacks by Recurrent Deletion of a *Pitx1* Enhancer. *Science* 327 (5963): 302–5.
- Chen, H., & Johnson, R. L. 1999.** Dorsoventral Patterning of the Vertebrate Limb: A Process Governed by Multiple Events. *Cell and Tissue Research* 296(1): 67–73.
- Irimia, M. 2012.** Comparative Genomics of the Hedgehog Loci in Chordates and the Origins of Shh Regulatory Novelties. *Scientific Reports* 2(1): 433.
- Chiang, C. et al. 2001.** Manifestation of the Limb Prepattern: Limb Development in the Absence of Sonic Hedgehog Function. *Developmental Biology* 236(2): 421–35.
- Infante, C. 2015.** Shared Enhancer Activity in the Limbs and Phallus and Functional Divergence of a Limb-Genital Cis-Regulatory Element in Snakes. *Developmental Cell* 35(1):107–19.
- Isaac, A. et al. 2000.** FGF and Genes Encoding Transcription Factors in Early Limb Specification. *Mechanisms of Development* 93: 41–48.
- Itoyama, T. et al. 2019.** FGF- and SHH-Based Molecular Signals Regulate Barbel and Craniofacial Development in Catfish. *Zoological Letters* 5(1): 19.
- Johanson, Z. 2007.** Fish Fingers: Digit Homologues in Sarcopterygian Fish Fins. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 308(6): 757–768.
- Johnson, R. L. & Tabin, C. J. (1997)** Molecular Models for Vertebrate Limb Development. 90(6), 979–990.

- Jurberg, A. D. et al. 2013.** Switching Axial Progenitors from Producing Trunk to Tail Tissues in Vertebrate Embryos. *Developmental Cell* 25(5): 451–62.
- Kawakami, Y. 2001.** WNT Signals Control FGF-Dependent Limb Initiation and AER Induction in the Chick Embryo. *Cell* 104(6): 891–900.
- Kherdjemil, Y. et al. 2016.** Evolution of Hoxa11 regulation in vertebrates is linked to the pentadactyl state. *Nature* 539(7627): 89–92.
- Khokha, M. K. 2003.** Gremlin Is the BMP Antagonist Required for Maintenance of Shh and Fgf Signals during Limb Patterning. *Nature Genetics* 34(3): 303–7.
- Kmita, M. et al. 2002.** Serial Deletions and Duplications Suggest a Mechanism for the Collinearity of Hoxd Genes in Limbs. *Nature* 420(6912): 145–50.
- Kmita, M. et al. 2005.** Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 435(7045): 1113–1116.
- Kobayashi, D. et al. 2006.** Development of the Endoderm and Gut in Medaka, *Oryzias Latipes*. *Development, Growth and Differentiation*, 48(5): 283–95.
- Kondo, T. 1997.** Of Fingers, Toes and Penises. *Nature* 390(6655): 29.
- Kondo, T. et al. 1996.** Function of posterior HoxD genes in the morphogenesis of the anal sphincter. *Development* 122: 2651–2659.
- Kraus, P. 2001.** Some Distal Limb Structures Develop in Mice Lacking Sonic Hedgehog Signaling. *Mechanisms of Development* 100(1): 45–58.
- Kumar, S. & Duester, G. 2014.** Retinoic Acid Controls Body Axis Extension by Directly Repressing Fgf8 Transcription. *Development* 141(15): 2972–77.
- Kuratani, S. 2005.** Evolution of the vertebrate jaw: comparative embryology and molecular developmental biology reveal the factors behind evolutionary novelty. *Journal of Anatomy* 205(5): 335–47.
- Kurzrock, E. A. et al. 1999.** Epithelial-Mesenchymal Interactions in Development of the Mouse Fetal Genital Tubercle. *Cells Tissues Organs* 164(3): 125–130.
- Kvon, E. Z. et al. 2016.** Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution. *Cell* 167(3): 633–642.e11.
- LaMarca, M. J. 1964.** The Functional Anatomy of the Clasper and Clasper Gland of the Yellow Stingray, *Urolophus Jamaicensis* (Cuvier). *Journal of Morphology* 114(2): 303–23.
- Laufer, E. et al. 1997.** Expression of Radical Fringe in Limb-Bud Ectoderm Regulates Apical Ectodermal Ridge Formation. *Nature* 386(6623): 366–73.
- Leal, F. & Cohn, M. J. 2014.** Development of Hemipenes in the Ball Python Snake *Python Regius*. *Sexual Development* 9(1): 6–20.
- Leal, F. & Cohn, M. J. 2016.** Loss and Re-Emergence of Legs in Snakes by Modular Evolution of Sonic Hedgehog and HOXD Enhancers. *Current Biology* 26 (21): 2966–73.
- Letelier, J. et al. 2018.** A conserved Shh cis-regulatory module highlights a common developmental origin of unpaired and paired fins. *Nature Genetics* 50(4): 504–9.
- Lettice, L. A. et al. 2017.** The Conserved Sonic Hedgehog Limb Enhancer Consists of Discrete Functional Elements That Regulate Precise Spatial Expression. *Cell Reports* 20(6): 1396–1408.
- Liao, B. & Oates, A.,C. 2017.** Delta-Notch Signalling in Segmentation". *Arthropod Structure & Development* 46, č. 3 (květen 2017): 429–47.
- Lin, C. et al. 2013.** Delineating a Conserved Genetic Cassette Promoting Outgrowth of Body Appendages. *PLoS Genetics* 9(1): e1003: 231.
- Logan, C. et al. 1997.** The Role of Engrailed in Establishing the Dorsoventral Axis of the Chick Limb. *Development* 124(12): 2317–24.
- Lonfat, N. et al. 2014.** Convergent Evolution of Complex Regulatory Landscapes and Pleiotropy at Hox Loci. *Science* 346(6212): 1004–6.
- Long, J. A. et al. 2014.** Copulation in antiarch placoderms and the origin of gnathostome internal fertilization. *Nature* 517(7533): 196–199.
- Loomis, C. et al. 1996.** The mouse *Engrailed-1* gene and ventral limb patterning. *Nature* 382: 360–363.
- Maden, M. et al. 1993.** The Homeotic Transformation of Tails into Limbs in *Rana temporaria* by Retinoids. *Developmental Biology* 159(2): 379–391.

- Mallo, M. 2019.** The vertebrate tail: A gene playground for evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(6):1021-1030.
- Mallo, M. 2018.** Reassessing the Role of Hox Genes during Vertebrate Development and Evolution. *Trends in Genetics* 34(3): 209–17.
- Mao, J. et al. 2009.** Fgf-Dependent Etv4/5 Activity Is Required for Posterior Restriction of Sonic Hedgehog and Promoting Outgrowth of the Vertebrate Limb. *Developmental Cell* 16(4): 600–606.
- Marcil, A. et al. 2003.** Pitx1 and Pitx2 Are Required for Development of Hindlimb Buds. *Development* 130(1): 45–55.
- Mariani, F. V. et al. 2008.** Genetic Evidence That FGFs Have an Instructive Role in Limb Proximal–Distal Patterning. *Nature* 453 (7193): 401–5.
- Marinić, M. et al. 2013.** An Integrated Holo-Enhancer Unit Defines Tissue and Gene Specificity of the Fgf8 Regulatory Landscape. *Developmental Cell* 24(5): 530–42.
- Matsubara, Y. et al. 2017.** Anatomical Integration of the Sacral–Hindlimb Unit Coordinated by GDF11 Underlies Variation in Hindlimb Positioning in Tetrapods. *Nature Ecology & Evolution* 1(9): 1392–99.
- Matsuura, M. et al. 2008.** Identification of four Engrailed genes in the Japanese lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Developmental Dynamics* 237(6): 1581–1589.
- McPherron, A. C. 2009.** Redundancy of Myostatin and Growth/Differentiation Factor 11 Function. *BMC Developmental Biology* 9(1): 24.
- McPherron, A., Lawler, A. & Lee, S. 1999.** Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nature Genetics* 22: 260–264.
- Menke, D. B. et al. 2008.** Dual Hindlimb Control Elements in the Tbx4 Gene and Region-Specific Control of Bone Size in Vertebrate Limbs. *Development* 135(15): 2543–53.
- Metscher, B. D. et al. 2005.** Expression of Hoxa-11 and Hoxa-13 in the pectoral fin of a basal ray-finned fish, *Polyodon spathula*: implications for the origin of tetrapod limbs. *Evolution & Development* 7(3): 186–195.
- Mikkola, M. L. 2007.** Genetic basis of skin appendage development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18(2): 225–236.
- Minarik, M. et al. 2017.** Pre-Oral Gut Contributes to Facial Structures in Non-Teleost Fishes". *Nature* 547 (7662): 209–12.
- Minguillon, C. et al. 2009.** Tbx4/5 Gene Duplication and the Origin of Vertebrate Paired Appendages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(51): 21726–30.
- Minguillon, C., S. Nishimoto, S. Wood, E. Vendrell, J. J. Gibson-Brown, a M. P. O. Logan. 2012.** Hox Genes Regulate the Onset of Tbx5 Expression in the Forelimb. *Development* 139 (17): 3180–88.
- Montavon, T. & Duboule, D. 2013.** Landscapes and Archipelagos: Spatial Organization of Gene Regulation in Vertebrates. *Trends in Cell Biology* 22(7): 347–54.
- Montavon, T. et al. 2008.** Modeling Hox Gene Regulation in Digits: Reverse Collinearity and the Molecular Origin of Thumbness. *Genes & Development* 22(3): 346–59.
- Morioka, S. et al. 2018.** Homeotic Transformation of Tails into Limbs in Anurans. *Development, Growth & Differentiation* 60(6): 365–76.
- Moreau, Ch. et al. 2019.** Timed Collinear Activation of Hox Genes during Gastrulation Controls the Avian Forelimb Position. *Current Biology* 29 (1): 35-50.e4.
- Naiche, L. A. & Papaioannou, V.E. 2007.** Tbx4 Is Not Required for Hindlimb Identity or Post-Bud Hindlimb Outgrowth. *Development* 134(1): 93–103.
- Naiche, L. A., Holder, N. & Mark Lewandoski. 2011.** FGF4 and FGF8 comprise the wavefront activity that controls somitogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(10): 4018.
- Nelson, C. E. et al. 1996.** Analysis of Hox Gene Expression in the Chick Limb Bud. *Development* 122(5): 1449–66.
- Ng, J., et al. 2002.** The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10. *Development* 129: 5161-5170.
- Nishimoto, S. et al. 2014.** A Combination of Activation and Repression by a Colinear Hox Code Controls Forelimb-Restricted Expression of Tbx5 and Reveals Hox Protein Specificity. *PLoS Genetics* 10(3): e1004245.

- Niswander, L., & Martin, G. R. 1993.** FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* 361(6407): 68–71.
- Noordermeer, D., 2011.** The Dynamic Architecture of Hox Gene Clusters. *Science* 334(6053): 222–225.
- O'Shaughnessy et al. 2015.** Molecular Development of Chondrichthyan Claspers and the Evolution of Copulatory Organs. *Nature Communications* 6(1): 6698.
- Ohta, S. et al. 2007.** Cessation of Gastrulation Is Mediated by Suppression of Epithelial-Mesenchymal Transition at the Ventral Ectodermal Ridge. *Development* 134 (24): 4315–24.
- Olivera-Martinez, I. et al. 2012.** Loss of FGF-Dependent Mesoderm Identity and Rise of Endogenous Retinoid Signalling Determine Cessation of Body Axis Elongation. *PLoS Biology* 10(10): e1001415.
- Onimaru, K. et al. 2011.** Development and Evolution of the Lateral Plate Mesoderm: Comparative Analysis of Amphioxus and Lamprey with Implications for the Acquisition of Paired Fins. *Developmental Biology* 359(1): 124–36.
- Onimaru, K. & Kuraku. S. 2018.** Inference of the Ancestral Vertebrate Phenotype through Vestiges of the Whole-Genome Duplications. *Briefings in Functional Genomics* 17(5): 352–61.
- Osterwalder, M., 2014.** HAND2 Targets Define a Network of Transcriptional Regulators That Compartmentalize the Early Limb Bud Mesenchyme. *Developmental Cell* 31(3): 345–57.
- Paço, A. & Renata F. (2018)** Hox D Genes and the *Fin-to-Limb* Transition: Insights from Fish Studies. *Genesis* 56(1): e23069.
- Pascoal, S. 2007.** A Molecular Clock Operates During Chick Autopod Proximal-Distal Outgrowth. *Journal of Molecular Biology* 368,(2): 303–9.
- Pearson, J. C., Lemons, D., & McGinnis, W. 2005.** Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews Genetics* 6(12): 893–904.
- Perriton et al. 2002.** Sonic Hedgehog Signaling from the Urethral Epithelium Controls External Genital Development. *Developmental Biology* 247(1): 26–46.
- Peter, I. S., Davidson, E., H, 2011.** Evolution of Gene Regulatory Networks Controlling Body Plan Development. *Cell* 144(6): 970–85.
- Peterson, K. J. & Davidson, E. H. 2000.** Regulatory Evolution and the Origin of the Bilaterians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, (9): 4430–33.
- Petit, F. et al. 2017.** Limb Development: A Paradigm of Gene Regulation. *Nature Reviews Genetics* 18(4): 245–58.
- Pignatti, E. et al. 2014.** To BMP or not to BMP during vertebrate limb bud development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 32: 119–127.
- Pizette, S., C. Abate-Shen & Niswander, L., 2001.** BMP Controls Proximodistal Outgrowth, via Induction of the Apical Ectodermal Ridge, and Dorsoventral Patterning in the Vertebrate Limb. *Development* 128(22): 4463–74.
- Pourquié, O. (2011)** Vertebrate Segmentation: From Cyclic Gene Networks to Scoliosis". *Cell* 145, č. 5 (květen 2011): 650–63.
- Rallis, C 2003.** Tbx5 Is Required for Forelimb Bud Formation and Continued Outgrowth. *Development* 130(12): 2741–51.
- Resende, T., P., Andrade R. P. & Palmeirim, I. 2014.** Timing Embryo Segmentation: Dynamics and Regulatory Mechanisms of the Vertebrate Segmentation Clock. *BioMed Research International* 2014:1–12.
- Riddle, R., D. et al. 1993.** Sonic Hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA. *Cell* 75(7): 1401–16.
- Richardson, M., K. 1998.** Somite Number and Vertebrate Evolution. *Development* 125: 151–160.
- Richardson, M. K., Jeffery, J. E., & Tabin, C., J. 2004.** Proximodistal Patterning of the Limb: Insights from Evolutionary Morphology. *Evolution & Development* 6(1): 1–5
- Richardson, J. et al. 2012.** The Presence of an Embryonic Opercular Flap in Amniotes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, (1727): 224–29.
- Roberts et al. 1995.** Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development*, 121: 3163–3174.
- Rodriguez-Esteban, C. 1997.** Radical Fringe Positions the Apical Ectodermal Ridge at the Dorsoventral Boundary of the Vertebrate Limb. *Nature* 386, (6623): 360–66.
- Ruvinsky, I. & Gibson-Brown, J., J. 2000.** Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution. *Development* 127: 5233–5244.

Sagai, T. et al. 2005. Elimination of a Long-Range Cis-Regulatory Module Causes Complete Loss of Limb-Specific Shh Expression and Truncation of the Mouse Limb". *Development* 132 (4): 797–803.

Sagai, T. et al., 2009. A Cluster of Three Long-Range Enhancers Directs Regional Shh Expression in the Epithelial Linings. *Development* 136(10): 1665–74.

Sagai, T. et al., 2017. Evolution of Shh Endoderm Enhancers during Morphological Transition from Ventral Lungs to Dorsal Gas Bladder. *Nature Communications* 8(1): 14300.

Sanger, Thomas J., Marissa L. Gredler, a Martin J. Cohn. 2015. Resurrecting Embryos of the Tuatara, *Sphenodon Punctatus*, to Resolve Vertebrate Phallus Evolution. *Biology Letters* 11 (10): 20150694.

Sanz-Ezquerro, J., J. & Tickle, C., 2003. Fgf Signaling Controls the Number of Phalanges and Tip Formation in Developing Digits. *Current Biology* 13(20): 1830–36.

Sauka-Spengler, T. et al. 2002. Expression Patterns of an Otx2 and an Otx5 Orthologue in the Urodele *Pleurodeles Waltl*: Implications on the Evolutionary Relationships between the Balancers and Cement Gland in Amphibians. *Development Genes and Evolution* 212(8): 380–87.

Sakamoto, K. (2009). Heterochronic Shift in Hox-Mediated Activation of Sonic Hedgehog Leads to Morphological Changes during Fin Development. *PLoS ONE*, 4(4): e5121.

Scotti, M., 2015. A Hoxa13:Cre mouse strain for conditional gene manipulation in developing limb, hindgut, and urogenital system. *Genesis* 53(6): 366–376.

Seifert, A.W. et al. 2010. Sonic Hedgehog Controls Growth of External Genitalia by Regulating Cell Cycle Kinetics. *Nature Communications*, 1(1): 23.

Sekine, K. et al. 1999. Fgf10 Is Essential for Limb and Lung Formation. *Nature Genetics*, 21(1):138–41.

Sheeba, C. J. et al. 2012. Joint Interpretation of AER/FGF and ZPA/SHH over Time and Space Underlies Hairy2 Expression in the Chick Limb. *Biology Open*, 1(11): 1102–10.

Sheeba, C. J., Andrade R., P. & Palmeirim, I. 2016. Mechanisms of Vertebrate Embryo Segmentation: Common Themes in Trunk and Limb Development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 49: 125–34.

Shubin, N., Tabin, C., & Carroll, S. 2009. Deep Homology and the Origins of Evolutionary Novelty. *Nature* 457(7231): 818–23.

Scherz, P. J. 2004. The Limb Bud Shh-Fgf Feedback Loop Is Terminated by Expansion of Former ZPA Cells. *Science* 305(5682): 396–99.

Schneider, I. et al. 2011. Expression Driven by the Hoxd Global Control Region Is an Ancient Gnathostome Feature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(31):12782–86.

Schneider, I. & Shubin, N. H. 2013. The Origin of the Tetrapod Limb: From Expeditions to Enhancers. *Trends in Genetics* 29(7): 419–26.

Schubert, M. et al. 2000. Characterization of an amphioxus Wnt gene, *Amphi Wnt11*, with possible roles in myogenesis and tail outgrowth. *Genesis* 27(1): 1–5.

Simeone, A. 1992. Nested Expression Domains of Four Homeobox Genes in Developing Rostral Brain. *Nature* 358(6388): 687–90.

Smith, J. J. et al. 2013. Sequencing of the Sea Lamprey (*Petromyzon Marinus*) Genome Provides Insights into Vertebrate Evolution. *Nature Genetics* 45(4): 415–21, 421e1-2.

Sordino, P., van der Hoeven, F. & Duboule, D. 1995. Hox Gene Expression in Teleost Fins and the Origin of Vertebrate Digits. *Nature* 375(6533): 678–81.

Soshnikova, N. & Duboule, D. 2009. Epigenetic Temporal Control of Mouse Hox Genes in Vivo. *Science* 324(5932): 1320–23.

Soshnikova, N. et al. 2013. Duplications of Hox Gene Clusters and the Emergence of Vertebrates. *Developmental Biology* 378(2): 194–99.

Spielmann, M. et al. 2012. Homeotic Arm-to-Leg Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the PITX1 Locus. *The American Journal of Human Genetics* 91(4): 629–35.

Spitz, F. et al. 2003. A Global Control Region Defines a Chromosomal Regulatory Landscape Containing the HoxD Cluster. *Cell* 113(3): 405–17.

Spitz, F. & Furlong, E. E. M. 2012. Transcription Factors: From Enhancer Binding to Developmental Control. *Nature Reviews Genetics* 13(9): 613–26.

Swenson, J. D. et al. 2018. How the Devil Ray Got Its Horns: The Evolution and Development of Cephalic Lobes in Myliobatid Stingrays (Batoidea: Myliobatidae). *Frontiers in Ecology and Evolution* 6: 181.

Symmons, O. et al. 2016. The Shh Topological Domain Facilitates the Action of Remote Enhancers by Reducing the Effects of Genomic Distances. *Developmental Cell* 39(5): 529–43.

Štundl, J. et al. 2019. Bichir external gills arise via heterochronic shift that accelerates hyoid arch development. Editoval Tanya T Whitfield, Diethard Tautz, Andrew Gillis, a Per E Ahlberg. *eLife* 8: e43531.

Takeuchi, J. K. et al. 1999. Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* 398(6730): 810–814.

Tanaka, M. et al. 1998. Apical ectodermal ridge induction by the transplantation of En-1-overexpressing ectoderm in chick limb bud Development. *Growth & Differentiation* 40: 423–429.

Tanaka, M. et al. 2002. Fin development in a cartilaginous fish and the origin of vertebrate limbs. *Nature* 416(6880): 527–531.

Tanaka, M. et al. 2013. Molecular and Evolutionary Basis of Limb Field Specification and Limb Initiation. *Development, Growth & Differentiation* 55,(1): 149–63.

Tarazona, O. A. et al. 2019. Evolution of Limb Development in Cephalopod Mollusks. *eLife* 2019;8:e43828.

Tarchini, B., Duboule, D. & Kmita, M. 2006. Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior–posterior polarity. *Nature* 443(7114): 985–988.

Tickle, C. & Towers, M. 2017. Sonic Hedgehog Signaling in Limb Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5. doi:10.3389/fcell.2017.00014

Tickle, C. 2015. How the Embryo Makes a Limb: Determination, Polarity and Identity. *Journal of Anatomy* 227(4): 418–30.

Tschopp, P. & Duboule, D. 2011a. A Genetic Approach to the Transcriptional Regulation of Hox Gene Clusters. *Annual Review of Genetics* 45(1): 145–66.

Tschopp, P. & Duboule, D. 2011b. A Regulatory ‘Landscape Effect’ over the HoxD Cluster. *Developmental Biology* 351(2): 288–96.

Tulenko, F. J. et al. 2013. Body Wall Development in Lamprey and a New Perspective on the Origin of Vertebrate Paired Fins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(29): 11899–904.

Tulenko, F. J. et al. 2016. HoxD Expression in the Fin-Fold Compartment of Basal Gnathostomes and Implications for Paired Appendage Evolution. *Scientific Reports* 6(1): 22720.

Verheyden, J. M. & Xin, S. 2008. An Fgf/Gremlin Inhibitory Feedback Loop Triggers Termination of Limb Bud Outgrowth. *Nature* 454(7204): 638–41.

Wang, B. 2000. Hedgehog-Regulated Processing of Gli3 Produces an Anterior/Posterior Repressor Gradient in the Developing Vertebrate Limb. *Cell* 100(4): 423–34.

Wellik, D. M., et al. 2003. Hox10 and Hox11 Genes Are Required to Globally Pattern the Mammalian Skeleton. *Science* 301 (5631): 363–67.

Welscher, P. 2002a. Mutual Genetic Antagonism Involving GLI3 and DHAND Prepatterns the Vertebrate Limb Bud Mesenchyme Prior to SHH Signaling. *Genes & Development* 16(4): 421–26.

Welscher, P. 2002b. Progression of Vertebrate Limb Development Through SHH-Mediated Counteraction of GLI3. *Science* 298(5594): 827–830.

Williamson, I. et al. 2016. Shh and ZRS Enhancer Colocalisation Is Specific to the Zone of Polarising Activity. *Development* 143(16): 2994–3001.

Woltering J. M. et al. 2014. Conservation and Divergence of Regulatory Strategies at Hox Loci and the Origin of Tetrapod Digits. *PLoS Biology*, e1001773.

Woltering, J. M. & Duboule, D. 2010. The Origin of Digits: Expression Patterns versus Regulatory Mechanisms. *Developmental Cell* 18(4): 526–32.

Wymeersch, F. J. et al. 2016. Position-Dependent Plasticity of Distinct Progenitor Types in the Primitive Streak. *ELife* 5, e10042.

Xu, B. & Wellik D. M. 2011. Axial Hox9 Activity Establishes the Posterior Field in the Developing Forelimb. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(12): 4888–91.

Yamada, G. et al. 2006. Molecular Genetic Cascades for External Genitalia Formation: An Emerging Organogenesis Program. *Developmental Dynamics* 235(7): 1738–52.

Yamaguchi, T. et al. 1999. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126: 1211–1223.

- Yano, T. & Tamura, K. 2012.** The making of differences between fins and limbs. *Journal of Anatomy* 222(1): 100–113.
- Yano, T. & Tamura, K. 2013.** The Making of Differences between Fins and Limbs: The Making of Differences between Fins and Limbs. *Journal of Anatomy* 222(1): 100–113.
- Yokouchi, Y. 1995.** Misexpression of Hoxa-13 Induces Cartilage Homeotic Transformation and Changes Cell Adhesiveness in Chick Limb Buds. *Genes & Development* 9(20): 2509–22.
- Zakany, J. & Duboule, D. 2005.** The Role of Hox Genes during Vertebrate Limb Development. *Current Opinion in Genetics & Development* 17(4): 359–66.
- Zákány, J., Kmita M. & Duboule, D. 2004.** A Dual Role for Hox Genes in Limb Anterior-Posterior Asymmetry. *Science* 304: 1669–1672.
- Zhao, X. et al. 2009.** Retinoic Acid Promotes Limb Induction through Effects on Body Axis Extension but Is Unnecessary for Limb Patterning. *Current Biology* 19(12): 1050–57.

Sekundární citace

- *Saunders, J. W. & Gasseling, M. 1968.** Ectodermal-mesenchymal interaction in the origin of limb symmetry. In *Epithelial-Mesenchymal Interaction*, R. Fleischmayer and R. E. Billingham, eds., pp 78-97. citováno dle, **Riddle, D. et al. 1993.** Sonic Hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA. *Cell* 75(7): 1401–16.
- *Gegenbaur, C. 1878.** *Elements of comparative anatomy*, Macmillan and Co., London, citováno dle **Coates, M. 2003.** The Evolution of Paired Fins. *Theory in Biosciences*, 122(2-3), 266–287.