

# Univerzita Karlova

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Dan Smlsal**

Antero-posteriorní polarizace tělních extremít u  
obratlovců

Antero-posterior polarization of body appendages in  
vertebrates

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vladimír Soukup, PhD.

Praha, 2021

*Poděkování:* Chtěl bych poděkovat svému školiteli, Mgr. Vladimíru Soukupovi PhD. za úžasnou pomoc při psaní této práce a čas, který mi věnoval.

**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, 10. 8. 2021

Podpis:

## **Abstrakt**

Tělní výběžky obratlovců jsou struktury, které během embryonálního vývoje vznikají laterálním růstem od hlavní centrální osy těla. I přes jejich vysokou diverzitu a rozdílnou stavbu jsou všechny tyto struktury organizovány podél tří hlavních os. Polarizace podél antero-posteriorní osy těla je nejvýraznější, co se diferenciací tělních extremit týče. Tyto polarizované diferenciační proměny jsou nejlépe probádány v končetinách, kde jsou kontrolovány zejména organizačním centrem jménem polarizační centrum (ZPA). Toto centrum interaguje s druhým centrem jménem apikální ektodermální lišta (AER), jejíž vliv se uplatňuje hlavně ve vyrůstání končetiny laterálně od těla. ZPA produkuje především Sonic hedgehog (Shh), včetně několika dalších signálních molekul napomáhajících polarizaci. Je součástí hlavní a vysoce konzervované signální dráhy napříč polarizovanými strukturami, a je ovlivňován třeba kyselinou retinovou (RA), která se podílí i na vzniku samotného ZPA. Jejich aktivita stimuluje sekreci fibroblastových růstových faktorů (Fgf) a kostních morfogenních proteinů (Bmp). Všechny tyto signální dráhy jsou zodpovědné za správnou diferenciaci fungujících výběžků veskrze interakční a koncentrační mechanismy. Cílem této práce je blíže seznámit čtenáře také s mechanismy polarizace dalších tělních extremit, jako vnější genitálie a deriváty branchiálních oblouků. Tato problematika byla pojata komparativně s vývojem v končetině. Zároveň práce funguje jako základový materiál pro další výzkum polarizačních mechanismů hlavně ve vývoji vnější žábry.

**Klíčová slova:** Obratlovci, antero-posteriorní polarizace, Sonic hedgehog, končetina, vnější pohlavní orgány, branchiální oblouky, AER, ZPA, uretrální ploténka, GAER

## **Abstract**

Body appendages of vertebrates are structures developing during embryonal stages through lateral outgrowth from main body axis. Despite their different composition and high diversity, all these structures are organised along three main axes. Antero-posterior polarization is the most significant in body appendage differentiation. These polarized differentiation changes are best understood in the limbs, where they are controlled by the organizing centre named zone of polarizing activity (ZPA). This centre interacts with another centre named apical ectodermal ridge (AER), which mainly governs limb outgrowth laterally from the body axis. ZPA produces Sonic hedgehog (Shh), along with other signalling molecules participating in the polarization. Shh is a key part of highly conserved signalling pathway common to polarized structures and is influenced by retinoic acid (RA), which plays role in the ZPA creation. ZPA activity stimulates secretion of fibroblast growth factors (Fgf) and bone morphogenic proteins (Bmp). All these signalling pathways ensure correct differentiation of appendages through interaction and concentration-dependent mechanisms. The goal of this thesis is to introduce the mechanisms of polarization in other appendages, such as external genitalia and branchial arch derivatives to the reader, comparatively to limb development. Additionally, this thesis serves as a basis for future research of polarizing mechanisms, mainly in external gills.

**Key words:** Vertebrates, antero-posterior polarization, Sonic hedgehog, limb, external genitalia, branchial arches, AER, ZPA, urethral plate, GAER

## Obsah

Úvod .....	5
1 Antero-posteriorní polarizace končetin .....	7
1.1 Interakce signálních center .....	7
1.2 Prvotní experimenty a kyselina retinová coby polarizující agens .....	8
1.3 Sonic hedgehog coby polarizující agens .....	9
1.4 Sonic hedgehog signální dráha v končetinovém pupenu .....	10
1.5 Úloha Hox genů v antero-posteriorní polarizaci končetiny .....	12
1.6 Interakce Shh a dorzálního non-AER ektodermu .....	13
1.7 Pozitivní zpětná vazba ZPA a AER .....	14
1.8 Interakce Shh s faktory rodiny Bmp .....	15
2 Antero-posteriorní polarizace erektilních orgánů .....	16
2.1 Embryonální základ vnějších pohlavních orgánů .....	16
2.2 Úloha Shh v signalizaci genitálním tkáním .....	17
2.3 Shh jakožto polarizující agens v genitáliích .....	18
2.4 Ovlivnění polarizace pohlavními hormony .....	20
3 Antero-posteriorní polarizace faryngeálních oblouků .....	22
3.1 Branchiální signalizační centra .....	23
3.2 Shh coby polarizující agens v branchiálních strukturách .....	23
4. Závěr .....	24
Reference .....	25
Sekundární reference .....	36

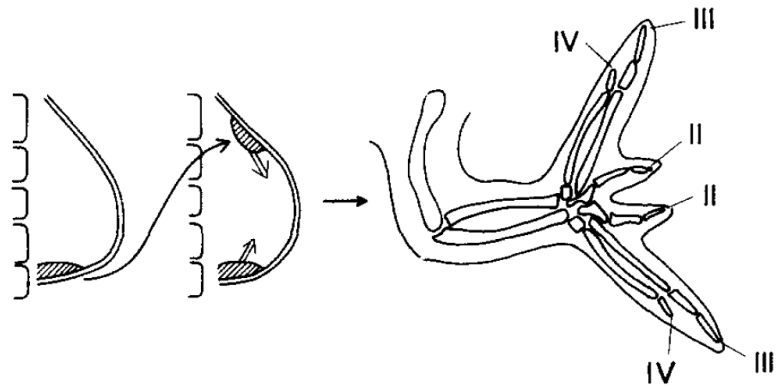
## Úvod

Téměř všechny základy párových výběžků na tělech obratlovců jsou během embryonálního vývoje při růstu podrobeny intenzivní diferenciaci, odpovídající jejich funkcím, modifikacím a proměnám. Tato diferenciace probíhá v trojrozměrném prostoru, a tudíž hned v několika osách v závislosti k tělu embrya, a to dorso-ventrální, proximo-distální a antero-posteriorní.

Kupříkladu při vyrůstání končetin se u obratlovců v proximo-distální ose postupně diferencují morfologicky specifické oddíly výběžku, které rozlišujeme na základě počtu a tvaru kostních elementů na stylopod, dále zeugopod a autopod. V modelu horní končetiny obsahuje stylopod jednu kost (humerus), zeugopod dvě (radius, ulna) a autopod velké množství menších kostí (zápěstí, kůstky prstní a záprstní). Antero-posteriorní polarizační vliv je nejvíce znatelný v autopodním regionu, méně pak i v zeugopodním, a to na vzájemném umístění radiu a ulny.

Výzkum ve vývojové biologii poukázal na důležitost polarizačních systémů a poziční informace jednotlivých buněk v proximo-distálním vývoji horních končetin kuřecích embryí (Wolpert, 1969). Dalšími postupnými experimenty byl odhalen speciální region buněk, který v končetině funguje jako organizační centrum právě antero-posteriorní polarizace. Cesta k tomuto objevu byla ale v minulosti poměrně dlouhá. Nejprve bylo zjištěno, že v základech končetin, hlavně v posteriorní oblasti, dochází k masivnímu odumírání buněk, které jsou vzápětí nahrazovány novými diferencujícími buňkami (Saunders et al., 1962). Objevily se spekulace, že tyto jevy jsou nutné ke správnému vývoji končetiny, jelikož zanikající staré buňky dávají prostor novým a signalizují pro další vývoj končetiny. Tato oblast byla pojmenována „posterior necrotic zone“ (PNZ) (Saunders et al., 1962). Dalším postupem bylo experimentální odstranění PNZ pro sledování změny vývoje končetiny, avšak po provedení excize k žádným vývojovým vadám v končetinách nedošlo. Byly zde i pokusy o transplantaci na dorzální stranu končetinového základu a do somitů, avšak tyto transplantáty vytvořily v křídle pouze pár nadbytečných ektodermálních struktur a v somitech odumřely úplně (Saunders et al., 1962). Až později se přišlo na morfogenní funkce posteriorního končetinového mesodermu, a to právě experimentální transplantací posteriorní tkáně do anteriorní části vyvíjející se končetiny, čímž došlo k zrcadlové duplikaci posteriorních

elementů v zeugopodní a autopodní oblasti (viz Obr.1). Tento posteriorní region byl pojmenován „polarizing region“, nebo také „zone of polarizing activity“ (ZPA) (Saunders & Gasseling, 1968 podle Maccabe et al., 1973; Tickle et al., 1975). Ze získaných dat bylo vyvozeno, že ZPA produkuje určitý „morfogén“, který ostatním buňkám předává informaci udávající jejich polohu a vzdálenost od něj. Podle tohoto signálu se tedy mohou buňky stabilně diferencovat v rámci předozadní osy (Tickle et al., 1975). A zde odstartovalo extenzivní studium polarizace končetin podle antero-posteriorní osy.



Obr.1: Schéma transplantace ZPA do anteriorní části končetinového pupene a výsledná zrcadlová duplikace prstů (Riddle et al., 1993 podle Saunders & Gasseling, 1968), upraveno

Dalšími výzkumy byly odhaleny faktory, které fungují jako „morfogeny“ a hlavní mediátory poziční informace. Jako první byly zkoumány účinky kyseliny retinové na vyvíjející se končetiny. Aplikací papírku nasáknutého kyselinou retinovou do anteriorní části končetinového pupene bylo dosaženo stejné zrcadlové duplikace chrupavčitých elementů jako při zmíněné transplantaci, čímž byla potvrzena účast této látky při ustanovení ZPA (Tickle et al., 1982). Následně však byl izolován gen exprimovaný právě v ZPA, jehož produkt má velice silnou, koncentračně řízenou morfogenní funkci a je hlavním mediátorem poziční informace a polarizačního růstu. Tento gen byl pojmenován „Sonic hedgehog“ (Shh). Zároveň bylo zjištěno, že kyselina retinová dokáže indukovat zrcadlové duplikace právě ektopickou aktivací tkáně na anteriorní straně vyvíjející se končetiny tím, že stimuluje expresi Shh a způsobí ustanovení signalizační oblasti podobné ZPA (Riddle et al., 1993). Později se ukázalo, že Shh má polarizační funkci nejen v končetinách kuřat, ale i v končetinách a ploutvích (párových i nepárových) téměř u všech obratlovčích embryí (Akimenko & Ekker, 1995; Tulenko et al., 2017). Byla ukázána jeho polarizující aktivita i ve formování struktur ploutví u rejnoků (Dahn et al., 2007), což jen podporuje ancestrální původ tohoto systému. Toto jsou však pouze základní polarizační děje nalezené v končetinách, které se ale zdají být vysoce konzervované napříč všemi skupinami živočichů. Cílem této práce je popsat

polarizační činnost tkání v antero-posteriorní ose a její dopady na diferenciaci i výsledný tvar výběžků, dále specifikovat detaily vývoje v končetině a následně je v dalších kapitolách porovnat s polarizací např.: v žaberních obloucích nebo erektilních tělesech.

## **1 Antero-posteriorní polarizace končetin**

Končetiny, coby výběžky na tělech obratlovců, jsou zakládány nejčastěji laterálně od hlavní tělní osy v oblasti budoucí hrudi a pánve. Základem vyvíjející se končetiny je končetinový pupen, který se skládá z ektodermu a mezodermu. Tyto zárodečné vrstvy ovšem dále diferencují a každá z nich vytváří svá specifická organizační centra s určitou funkcí.

V ektodermu se vyvíjí apikální ektodermální hřeben (AER, apical ectodermal ridge), jež je hlavním signalizačním činitelem v proximo-distálním růstu a diferenciaci (Fernandez-Teran & Ros, 2008). V mezodermu se v posteriorní části pupene vytváří oblast s polarizující aktivitou (ZPA, zone of polarizing activity), která je hlavním hybatelem proměn v rámci antero-posteriorní osy.

Antero-posteriorní polarizace byla zkoumána hlavně u kuřat a myší, převážně v předních končetinách, protože se vyvíjejí dříve než zadní, přestože v obou párech probíhají velice podobné procesy. Ptačí model disponuje velice podobnou stavbou jako savčí, ale krom homologického humeru, radia a ulny má pouze 3 autopodní výběžky, pojmenované prsty 1,2 a 3 (v minulosti 2,3 a 4, kvůli předpokladu ztráty prstu 1 a 5 (Vargas & Fallon, 2005)). Oproti ptačímu modelu, savčí přední končetina je v autopodu podobnější se zadní, jelikož se zde diferencují prsty 1-5. Brány výzkumu polarizace končetin podle antero-posteriorní osy se otevřely po objevu ZPA. Velice zásadním zjištěním bylo, že tento systém posteriorního končetinového organizačního centra je vysoce konzervován napříč skupinami obratlovců. Tohoto poměrně důležitého odhalení bylo dosaženo skrze experimentální transplantaci myšího ZPA do anteriorní části kuřecího embryonálního základu křídla, přičemž došlo ke stejné duplikaci jako při transplantacích u jedinců stejného druhu (Tickle et al., 1976).

### **1.1 Interakce signálních center**

V končetinovém pupenu se pohybujeme v trojrozměrném prostoru, a proto je velice důležité, aby spolu organizační centra této vyvíjející se struktury dobře a efektivně interagovala. Nejen že ZPA kontroluje antero-posteriorní polarizaci, ale také spolupracuje s dorsálním ektodermem na vyváženém vývoji v dorso-ventrální ose, a také stimuluje signální kaskádu apikálního ektodermálního hřebene (AER) k vyrůstání končetiny distálním

směrem a její diferenciaci v distální končetinové struktury. Jeho role ve vztahu k proximo-distálnímu vývoji byla demonstrována v pokusu implantace ZPA buněk do anteriorní části základu kuřecího křídla. Pokus spočíval buď v excizi kusu anteriorního mezodermu i společně s AER ektodermem, a následném vložení ZPA buněčného materiálu do výsledné ranky, nebo pouze odříznutím části AER ektodermu, jeho oddálením od mezodermu a vsunutím ZPA implantátu pod něj. V druhém případě vzniklo více duplikovaných prstů než v prvním, zřejmě kvůli zachování AER tkáně (Tickle, 1981). Dále bylo prokázáno, že polarizační činnost ZPA závisí na fyzické interakci s AER, což znamená, že obě struktury musí být úzce propojeny. Skutečnost, že jejich vzájemná blízkost je pro vývoj končetiny nezbytná vznáší hypotézu, že dosah tohoto organizačního aparátu je omezený. Tato hypotéza se ukázala být pravdivou, jelikož při transplantaci ZPA buněk do již vyvinutější končetiny, nebo při odstranění ZPA-asociované části AER v raných stádiích, došlo pouze k malým, nebo žádným změnám (Summerbell, 1974).

## **1.2 Prvotní experimenty a kyselina retinová coby polarizující agens**

Buňky ZPA se přirozeně vyskytují v posteriorní části základu končetiny, avšak aktivizace a proměna mezodermu v ZPA může být způsobena i fokální externí aplikací kyseliny retinové na kteroukoliv oblast vyvíjejícího se končetinového pupene (Tickle et al., 1982), čímž se opět indukují zrcadlové duplikace v autopodu a částečně zeugopodu. V minulosti také bylo zkoumáno, zda koncentrace kyseliny retinové ovlivňuje míru zrcadlové duplikace v končetině. Zmíněný výzkum prokázal, že čím větší koncentrace kyseliny retinové, tím extenzivnější byla i duplikace (Tickle et al., 1985). Samotná skutečnost, že kyselina retinová indukuje ZPA, byla ukázána na pokusu, v němž byly kuličky napuštěné kyselinou retinovou implantovány do anteriorní části končetinového základu. Po určité době byly kuličky vyjmuty, a následně byla zhojená část mezodermu transplantována do anteriorní oblasti končetinového pupene jiného embrya. Ve výsledku bylo dosaženo naprosto stejné zrcadlové duplikace jako při transplantaci nativního posteriorního ZPA (Wanek et al., 1991a), což potvrzuje, že kyselina retinová se podílí na indukci ZPA-aktivního mezodermu. Zároveň s tímto probíhal výzkum, zda je kyselina retinová samotná onou polarizační molekulou, která řídí antero-posteriorní diferenciaci. Při této sérii pokusů byly za pomoci in situ hybridizace sledovány receptory kyseliny retinové v kuřecím končetinovém pupenu, který byl v anteriorní části stimulován exogenně kyselinou retinovou, anebo do něj bylo transplantováno ZPA jako v předchozích pokusech. V případě aplikace kyseliny retinové se

exprimovalo velké množství receptorů pro kyselinu retinovou, avšak u transplantátu se tato exprese téměř vůbec neprojevila. Tato data poukázala na skutečnost, že ZPA s největší pravděpodobností musí produkovat nějaký sekundární „morfogen“ a ne přímo kyselinu retinovou (Noji et al., 1991).

### 1.3 Sonic hedgehog coby polarizující agens

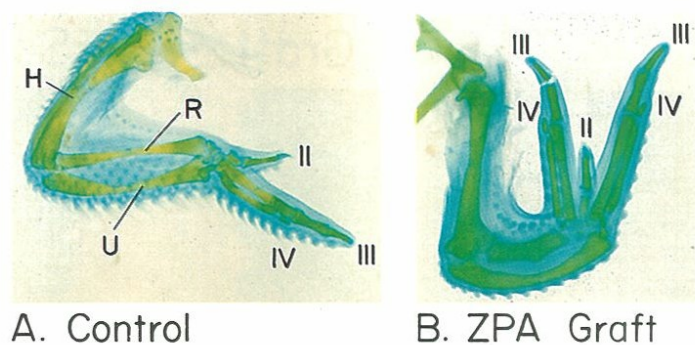
Jak již bylo řečeno, signální molekulou definující míru antero-posteriorní diferenciace je Sonic hedgehog, což bylo prokázáno na končetinovém základu kuřecího embrya (Riddle et al., 1993), a za jeho produkci jsou odpovědné právě ZPA-buňky. Jeho signalizační činnost je realizována na základě klesajícího koncentračního gradientu od místa sekrece (Gurdon et al., 1995), přičemž čím je koncentrace Shh vyšší, tím posteriornější elementy jsou zakládány a navíc se zvyšuje i jejich počet. Distální končetinové elementy jsou při transplantaci ZPA-buněk a exogenní indukci ZPA v anteriorní části končetinového pupene zrcadlově duplikované (viz Obr.2), protože posteriorní signál v anteriorní i posteriorní části zdánlivě přesouvá pomyslný „anterior“ končetinového pupenu na pomezí obou signalizačních center, kde je koncentrace signálních molekul nejslabší. V ideálním případě jsou v autopodu zrcadlově duplikované

končetiny, u modelu kuřecí horní končetiny, předozadně prsty 321123 (dříve 432234)(Vargas & Fallon, 2005); 1 jakožto nativně anteriorní, 3 jakožto nativně posteriorní (Tickle et al., 1975; Y. Yang et al., 1997).

V případě zeugopodu generuje sekundárně

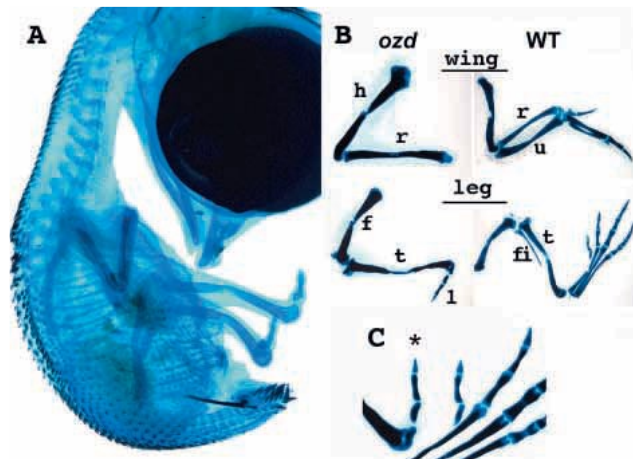
duplikovaný posteriorní signál sekundární anteriorní ulnu společně i s její (nativně posteriorní) muskulaturou a perními základy (Busby et al., 2020; Duprez et al., 1999).

Gradientovou hypotézu zároveň podporuje zjištění, že při anteriorní implantaci kuličky napuštěné roztokem s nižší koncentrací Shh (v rozmezí 1-16 mg/ml) byl zduplikován pouze prst 2 (prostřední) (Y. Yang et al., 1997). Co se týče šíření polarizujícího signálu tkáněmi, Shh



Obr.2: Kuřecí horní končetiny barvené Alcian green. Vlevo (A) je kontrolní vzorek s vyznačenými kostními elementy (H-humerus, R-radius, U-ulna) a očíslovanými prsty. Vpravo (B) je vzorek, na němž byla provedena transplantace ZPA do anteriorní části pupene a vyvinuly se zde duplikované prsty (vzorec 321123/43234) (Riddle et al., 1993), upraveno

má potenciál přenášet informaci i na vzdálenost větší, než je působení vlivu ZPA, ale pro lepší prostupnost tkáněmi potřebuje být modifikován cholesterolem (Lewis et al., 2001). Takto modifikovaný Shh může totiž pravděpodobně buď multimerizovat s ostatními identickými molekulami, čímž izoluje své hydrofobní domény a umožní tak mnohem potentnější šíření polarizujícího signálu (Zeng et al., 2001), nebo se ukotvit v membráně a procházet přímo skrz buňky jako intermembránový protein (Gritli-Linde et al., 2001).



Obr.3: Vzorčky kuřecích embryí barvené Alcian green. (A) Mutantní *ozd* embrya vykazují defektní vývoj pouze v končetinách. (B) Porovnání zárodečných končetin ve wild-type (WT) a *ozd* embryích. (C) Bližší záběr na autopody dolních končetin *ozd* (označen \*) a wild-type embryí. (Ros et al., 2003), upraveno

Pokud dojde ke ztrátě Shh signalizace, kupříkladu u kuřecích *ozd* mutantů, projeví se tzv.: „oligozeugodaktylní fenotyp“ (Ros et al., 2003). Tento fenotyp je způsoben vadou sekrece Shh v mezodermu, která zodpovídá za absenci tzv. Shh-dependentních končetinových elementů (Ros et al., 2003; Towers et al., 2008) a je realizován ztrátou zeugopodních a autopodních elementů, přesněji řečeno ulny a všech prstních kůstek v horní končetině, fibuly a všech prstů, kromě prstu 1, v dolní končetině (viz Obr.3). Navzdory tomuto defektu jsou však oligozeugodaktylní embrya stále schopná normálního vývoje v ostatních částech těla, jelikož bylo experimentálně prokázáno, že tato vada postihuje pouze končetinový mezoderm (Ros et al., 2003) a může být eliminována transplantací zdravého ZPA mezodermu do defektního pupene nebo ektopickou aplikací dostatečného množství Shh (Ros et al., 2003). Oproti zmíněným *ozd* mutantům se  $Shh^{-/-}$  embrya (myši), tj. klasičtí homozygotní celotělní Shh mutanti, nikdy nejsou schopna plně dovyvinout (Chiang et al., 1996).

#### 1.4 Sonic hedgehog signální dráha v končetinovém pupenu

Ve vývojové biologii se vztah dvou exprimovaných morfologických faktorů popisuje podle toho, který faktor indukuje expresi právě toho genu či faktoru, který je momentálním středem zájmu. Ty faktory, které ovlivňují expresi zkoumaného genu se nazývají „upstream“,

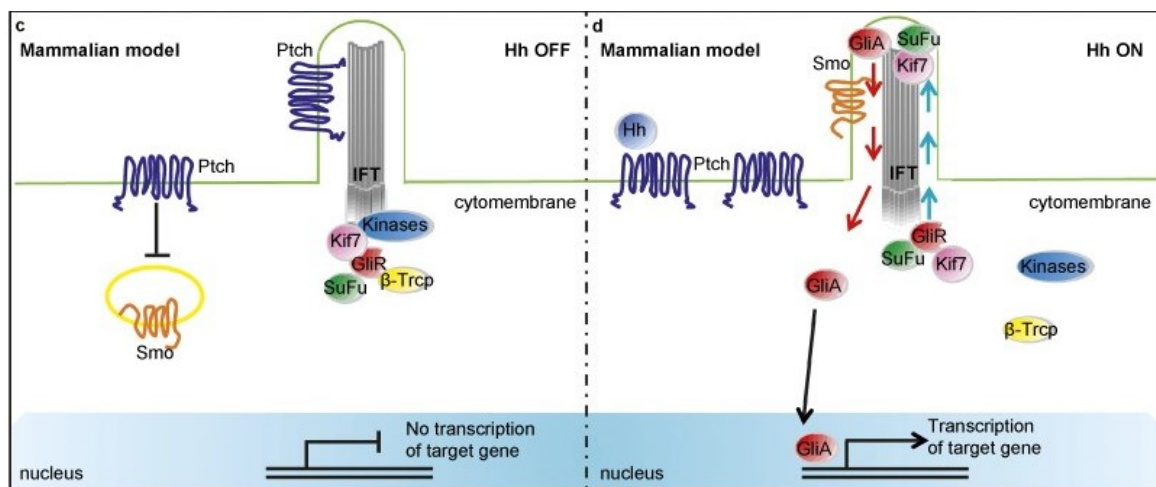
např.: Kyselina retinová je upstream od Sonic hedgehog, protože indukuje transformaci mezodermu v ZPA buňky (Wanek et al., 1991b), které ho produkují jakožto mediátor polarizující aktivity (Riddle et al., 1993). Oproti nim, „downstream“ jsou takové geny, jejichž exprese je ovlivňována zkoumaným faktorem, např.: Ptch (patched) a Gli jsou downstream od Sonic hedgehog.

Patched (Ptch1, Ptch2) je membránový protein ukotvený v buňkách reagujících na Shh signál, který je považován za jeden z jeho možných receptorů (Marigo, Davey, et al., 1996), jelikož se na něj s největší pravděpodobností navazuje přímo molekula Shh (Marigo, Davey, et al., 1996). Zároveň se dá konstatovat, že Ptch je „přímo downstream“ od Sonic hedgehog, protože nepotřebuje k aktivaci transkripce žádnou další stimulaci jinou signální molekulou, např.: Fgf nebo Bmp (Marigo, Scott, et al., 1996), a jeho exprese je regulována koncentrací Shh v okolí buňky. Když klesne, sníží se i exprese Ptch (Marigo, Scott, et al., 1996), což z něj dělá velmi dobrý indikátor přítomnosti a množství Shh ve tkáni (Duprez et al., 1998; Marigo, Scott, et al., 1996). Tato indikátorová funkce Ptch byla využita například při zjištění, že indukce pozitivní zpětné vazby (positive feedback loop) mezi Shh a Fgf4 (viz dále) v AER probíhá nepřímo, právě kvůli absenci Ptch v membránách buněk AER (Marigo, Scott, et al., 1996).

Smoothed (Smo) je transmembránový protein podobný G-proteinům, jehož funkce je nezbytná pro šíření a přijímání Shh signálu (Stone et al., 1996; van den Heuvel & Ingham, 1996). Bez přítomnosti Shh ligandu je aktivita Smo potlačena navázáním inaktivního Ptch (Stone et al., 1996). Při kontaktu Ptch/Smo komplexu se Shh ligandem je Smo uvolněn a aktivován (Stone et al., 1996). Toto propojení zajišťuje regulaci Shh-řízené proliferace tkání a například předchází vzniku nádorového bujení (Stone et al., 1996). Existují ale mutantní verze Smo, které tvoří komplex i s inaktivovaným Ptch, ale jsou imunní vůči jeho deaktivující činnosti. Tyto mutantní Smo jsou schopny obejít Shh signál (Murone et al., 1999) a dochází tak ke tvorbě tumorů.

Proteiny Gli v sobě mají „zinc finger“ domény a slouží jako transkripční faktory v transdukcii Shh signálu (Marigo, Johnson, et al., 1996). Jsou exprimované ve velmi podobných oblastech jako Ptch kvůli tomu, že jejich aktivátorem transkripce je právě Shh v kombinaci se Smo a též nejsou nativně exprimované v AER (Marigo, Johnson, et al., 1996). Je zde ale hned několik zásadních rozdílů. V obratlovčím embryu se vyskytují hned tři formy, přičemž první je Gli1,

kteřé je indukováno a stimulováno Shh signálem, ale je funkčně postradatelné a ne tak důležité jako ostatní Gli (Bai et al., 2002). Pro správný vývoj embrya je však nezbytné Gli2, fungující jako aktivátor procesů spojených se Shh signální dráhou (Bai et al., 2002) a Gli3, které se vyskytuje samostatně už v raném končetinovém pupenu a jehož expresi Shh snižuje, tudíž pracuje jako represor zmíněné dráhy (Marigo, Johnson, et al., 1996). Zároveň bylo prokázáno, že Gli proteiny dokáží ovlivňovat expresi Ptch, a to pokusem, při němž ektopická aplikace Gli umožnila indukovat Ptch v AER (Marigo, Johnson, et al., 1996). Z toho zároveň vyplývá, že Gli jsou upstream od Ptch, což jen prohlubuje vzájemnou propletenost polarizačních procesů v končetinách (viz Obr.4).



Obr.4: Znárodnění Hedgehog signální dráhy na modelu savčí buňky. Při absenci signálu (vlevo) je Smo drženo molekulou Ptch mimo senzitivní cilium, kde jeho místo zaujímá jiná molekula Ptch. Zároveň jsou Gli fosforylována kinázami, což má za výsledek represi jejich aktivační funkce. Při kontaktu s Hedgehog signální molekulou (vpravo) je Smo uvolněno do cilia a tam se ukotví na prázdné místo po Ptch. Gli jsou transportována intraflagelárním transportním systémem (IFT) do špičky cilia, kde nedochází k jejich modifikaci a je zachována jejich aktivačtorová funkce. (J. Yang et al., 2015), upraveno

### 1.5 Úloha Hox genů v antero-posteriorní polarizaci končetiny

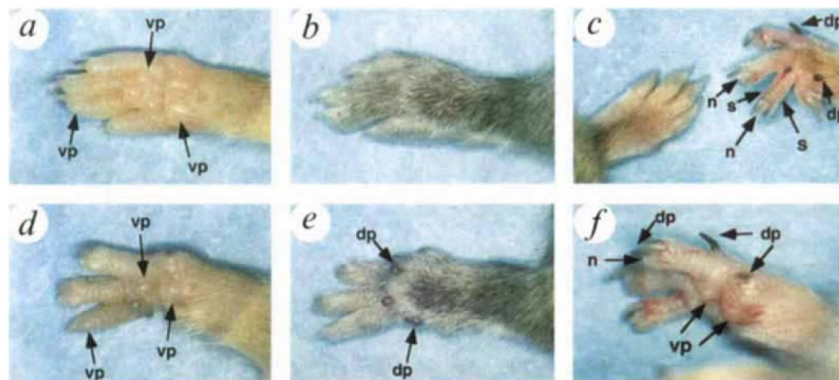
Hox geny jsou skupina poměrně konzervovaných transkripčních faktorů, které determinují podobu tělního plánu u živočichů a jsou exprimovány v oblastech, které dávají vznik specifickým strukturám. Jsou druhotně rozděleny do skupin Hoxa, Hoxb, Hoxc a Hoxd, přičemž v modelu kuřecího končetinového pupene jsou nejvýznamněji exprimovány geny Hoxa, podél celé antero-posteriorní osy, a Hoxd, hlavně v ZPA a jeho okolí (Dollé et al., 1989). Jejich raná exprese iniciuje aktivitu ZPA a AER (Zakany & Duboule, 2007), ale v pozdějších fázích Sonic hedgehog specifikuje jejich další funkci (Izpisúa-Belmonte et al., 1991; Riddle et al., 1993), hypoteticky skrze inaktivaci Gli3 (Litington et al., 2002), z čehož

vyplývá, že ZPA a AER koordinují jejich expresi ve vyvíjející se končetině (Nelson et al., 1996). Hlavně geny skupiny *Hoxd* se podílí na asymetrické diferenciaci podle antero-posteriorní osy (B. A. Morgan & Tabin, 1994) a striktní determinaci identity jednotlivých vyvíjejících se prstů (B. A. Morgan et al., 1992). Proto se v případě polydaktylního fenotypu vždy jedná o duplikaci prstu se určitou identitou (např.: duplikace palce 1, nebo malíčku 5), nikoliv o vznik prstu s novou identitou. Tato identita je však v polydaktylním fenotypu těžce rozpoznatelná.

### 1.6 Interakce *Shh* a dorzálního non-AER ektodermu

Kromě toho, že *Sonic Hedgehog* spouští kaskády genové exprese, je též sám regulován hned několika faktory. Jak bylo již zmíněno, AER navozuje ve vztahu se ZPA tzv.: „positive feedback loop“ (Laufer et al., 1994)(viz dále), což se dá vysvětlit jako vztah, kdy aktivita jednoho faktoru posiluje aktivitu druhého faktoru a stejně tak aktivita druhého posiluje první. Určitou podobnost má i interakce *Shh* s *Wnt7a*, signální molekulou dorzálního non-AER ektodermu končetinového pupenu, kdy při absenci *Wnt7a* nejen že dorzální část končetiny získává ventrální elementy (kožní polštářky myších tlapek; viz Obr.5) (Parr & McMahon, 1995), ale navíc dochází i ke ztrátě posteriorních elementů zeugopodu a autopodu (prst 5 a ulna). Je to pravděpodobně

způsobeno tím, že v mutantních jedincích, bez *Wnt7a*, v určitém stadiu vývoje klesá exprese *Shh* natolik, že způsobí uvedené defekty. Tato data naznačují, že *Wnt-7a* je nezbytný pro správnou funkci ZPA buněk (Parr & McMahon, 1995).

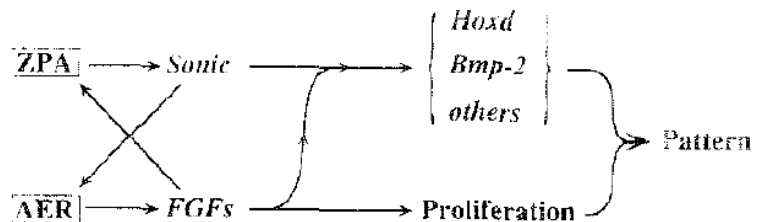


Obr.5: Demonstrace ventralizace myších tlapek při ztrátě *Wnt7a*. (a,b) Snímky horní končetiny wild-type mláďat z ventrální (a) a dorzální (b) strany. Snímek c ukazuje dorzální stranu končetiny wild-type (vlevo) a mutantního (vpravo) dospělého jedince. (d,e) Snímky mutantních horních končetin mláďat z ventrální (d) a dorzální (e) strany. (f) Snímek detailu mutantní končetiny dospělého jedince. Popsané struktury jsou ventrální polštářky (vp), dorzální polštářky (dp), drápky (n) a lysé strie (s). (Parr & McMahon, 1995), upraveno

## 1.7 Pozitivní zpětná vazba ZPA a AER

Sonic hedgehog ve své podstatě funguje jako signální organizační molekula, tudíž indukuje kaskády sekundárních „morfogenů“ jako jsou třeba různé Fgf (fibroblastové růstové faktory), které jsou produkované aktivizovanými buňkami AER. Těchto faktorů je hned několik a každý z nich má určitou roli ve vývoji různých struktur. Kupříkladu Fgf4 v končetině funguje hlavně jako mitogenní stimulant (podporuje v buňkách dělicí aktivitu a posouvání buněčného cyklu) především v distální oblasti končetinových základů (Niswander et al., 1993), ale jeho aktivita se evidentně vztahuje na oblast končetinového pupene obecně. Nejen že indukuje vyrůstání končetiny laterálně od těla, ale také pomáhá udržovat antero-posteriorní polarizační mechanismy v chodu. Fgf spolu se Shh fungují ve vzájemné interakci, kde Shh nepřímo indukuje sekreci Fgf4 v AER, přičemž Fgf4 též nepřímo působí na buňky ZPA ke stimulaci produkce Shh a také v buňkách spouští ZPA aktivitu v kombinaci s kyselinou retinovou (Niswander et al., 1994). Tento vztah se nazývá pozitivní zpětná vazba, neboli „positive feedback loop“ (Laufer et al., 1994). Navíc k tomu, aby mohly mezodermální buňky přijmout signál Shh pro zahájení sekrece ostatních sekundárních „morfogenů“ (např.: Bmp2), potřebují i stimulaci právě od Fgf4, která tuto aktivaci „verifikuje“ (Laufer et al., 1994). To bylo ukázáno experimentálním odstraněním anteriorního AER, vstříknutím viru exprimujícího Shh do té samé části základu a následnou variabilní aplikací kuličky napuštěnou Fgf4. Po exogenní aplikaci Fgf4

došlo k aktivaci a expresi Shh-aktivovaných „morfogenů“ (Laufer et al., 1994).



Obr.6: Schéma pozitivní zpětné vazby ZPA a AER. Shh signalizuje jak mezodermu, aby produkoval růstové a diferenační faktory, ale i AER, kde indukuje expresi Fgf4. Ten funguje jako proliferační stimulant mezodermálních buněk, a také udržuje expresi Shh v ZPA, čímž uzavírá zpětnovazebnou smyčku. (Laufer et al., 1994)

Mimo Fgf4 je velice důležitým faktorem exprimovaným v AER také Fgf8, a to zejména v raných

stádiích vývoje končetiny. Podílí se totiž na ustanovení končetinového pupene, odstartování sekrece Shh v ZPA a v pozdějších fázích udržuje sekreci Shh signálu (Crossley et al., 1996).

Mimo to ještě reguluje expresi Fgf4 a také funguje jako proliferační stimulant (Lewandoski et al., 2000; Moon & Capecchi, 2000).

Experimenty s interakcí Shh a Fgf ukazují důležitost propojení končetinových signálních center a pro správný vývoj je nezbytné, aby mohly jimi spouštěné procesy ve vyvíjejícím se pupenu společně probíhat zároveň (viz Obr.6).

### **1.8 Interakce Shh s faktory rodiny Bmp**

Kostní morfogenní proteiny (bone morphogenic proteins, Bmp) se podílí, jak jejich název napovídá, na formování a růstu kostí, svalů a pojivové tkáně (Tsumaki & Yoshikawa, 2005). Existuje hned několik variant těchto proteinů, avšak v rámci antero-posteriorní polarizace jsou nejdůležitější Bmp2, Bmp4 a Bmp7. Zprvu se i o Bmp uvažovalo jako o potenciálních signálních molekulách s polarizační aktivitou v antero-posteriorní rovině, jelikož společně s kyselinou retinovou dokázaly spustit genovou expresi velice podobnou té, kterou indukuje ZPA. Avšak pouze při pokusu s aplikací samotného Bmp2, opět za pomoci anteriorně implantované kuličky napuštěné roztokem o různých koncentracích, nevznikly ani v jednom případě žádné duplikované struktury (Francis et al., 1994). Bmp faktory se uplatňují také např.: při vývoji prstů, kdy Shh nejdříve aktivuje příslušné buňky mezodermu v distální oblasti základu končetiny a zároveň indukuje syntézu Bmp. Syntetizované Bmp jsou následně transportovány k aktivovaným buňkám budoucího autopodu, kde stimulují diferenciaci základní tkáně prstů a specifikují jejich pozdější antero-posteriorní identitu (Drossopoulou et al., 2000). Podle tohoto modelu lze diferenciaci prstů rozdělit na tzv. „priming phase“, kdy dochází k přípravě anteriorního mezodermu k vývoji prstů, přičemž se zde objevuje systematická deaktivace předchozích anteriorních signálů a introdukce posteriorního signálu, a tzv. „digit specification phase“, v níž se zvyšuje sekrece Bmp2 a je udržována na vysoké úrovni po celou dobu jejího trvání, aby zajistila správnou diferenciaci autopodních elementů ze Shh-aktivovaných buněk distálního mezodermu (Drossopoulou et al., 2000).

Gremlin je antagonistou Bmp2 (Hsu et al., 1998), ale jeho hlavní funkcí je přenášet signál Shh z posteriorního mezodermu do AER (Zúñiga et al., 1999), protože inhibice Bmp2 napomáhá sekreci Fgf4 a zajišťuje tak vznik a udržení pozitivní zpětné vazby (positive feedback loop) mezi Shh a Fgf4, což znamená, že jeho exprese je nutná pro správný vývoj končetin (Khokha et al., 2003). V pokusech provedených na Shh-deficientních mutantních embryích myší bylo prokázáno, že Gremlin je nejprve indukován jinými faktory, ale v pozdějších stádiích vývoje funguje přes Formin (Zúñiga et al., 1999) downstream od Shh a při ztrátě tohoto regulačního

signálu je jeho exprese časem umlčena (Zúñiga et al., 1999). Bmp-antagonistických genů je exprimováno hned několik, ale Gremlin se z nich zdá být vzhledem k polarizačním mechanismům nejvýznamnější.

Polarizační mechanismy v končetinách jsou velice spletitá síť jednotlivých molekulárních drah, které jsou zodpovědné za správný vývoj všech struktur, jaké by různé končetiny správně měly mít. Jsou to snad nejvíce diverzifikované tělní extremity, což odpovídá složitosti jejich diferenciačních procesů. Jak ale vypadá diferenciace v morfologicky jednodušších strukturách?

## **2 Antero-posteriorní polarizace erektilních orgánů**

Pohlavní orgány podléhají ontogenetickým vlivům velice podobným těm, které nalézáme v končetinách, avšak s jedním velice zásadním rozdílem. Jejich vývoj je silně ovlivněn pohlavními hormony daného organismu, přičemž vlivem samčích signálních molekul je stimulován vývoj penisu, vlivem samičích naopak vývoj vagíny. Oba typy kopulačních orgánů mají svou důležitou roli při aktu rozmnožování, jelikož se vyvinuly s cílem zefektivnit proces vnitřního oplození. U některých druhů obratlovců však tyto orgány nevznikají, nebo dokonce druhotně zanikají, přestože se též rozmnožují vnitřním oplozením. U takových živočichů probíhá předání gamet od samce samici skrze spojení kloak (Briskie & Montgomerie, 2001). Tak či tak, kopulace je základním dějem pro uskutečnění vnitřního oplození, proto je nutné, aby byly pohlavní orgány efektivní, funkční, ale hlavně kompatibilní.

### **2.1 Embryonální základ vnějších pohlavních orgánů**

Vývoj vnějších genitálií začíná v urogenitální membráně ventrálním vyboulením kloakálních řas, což jsou v raných stádiích embrya pouze párové mezenchymální výrůstky (Perriton et al., 2002). Ty ale postupem času srůstají mediálně do jediného útvaru s názvem genitální hrbolek (*genital tubercle*), jenž dává vznik penisu u samců a klitoris u samic (Murakami & Mizuno, 1986), a který jakožto morfologický útvar obsahuje oblasti nebo struktury složené ze všech tří embryonálních zárodečných vrstev. V základu se jedná o velice podobný případ jako u končetinového pupene, který se dá popsat jako mezodermální výrůstek obklopený ektodermem. Na rozdíl od něj má ale genitální hrbolek na ventrální straně i vrstvu původně kloakálních entodermálních buněk, které tvoří uretrální ploténku (*urethral epithelium*). Uretrální ploténka je jednou z nejdůležitějších struktur ve vývoji vnějších pohlavních orgánů, protože produkuje signální molekulu Shh do genitálního mezodermu. Disponuje tedy

polarizující aktivitou a také iniciuje růst a diferenciaci genitálií (Perriton et al., 2002). U savců se v rámci samčí ontogeneze uretrální ploténka invaginuje, uzavírá a postupně vytváří močovou trubici (*urethra*) procházející přímo skrz kopulační orgán (*penis*) (Seifert et al., 2008). Zároveň se zde z předkožkových základů (*preputial swellings*) vytváří předkožka (*prepuce*), která obepíná a chrání penis. U ostatních skupin obratlovců se uretrální ploténka neuzavírá a tvoří pouze vchlípenou rýhu s názvem *sulcus spermaticus* (Sanger et al., 2015). Speciální distální část uretrálního epitelu (*distal urethral epithelium*) má analogickou funkci k AER v končetině, což znamená, že také exprimuje různé růstové faktory a signální molekuly podporující vyrůstání a specifikaci pohlavních orgánů, hlavně ze skupin Fgf a Bmp. Je nutno také podotknout, že antero-posteriorní osa, v kontextu vývoje nepárových externích genitálií, odpovídá dorso-ventrální ose pohlavního orgánu samotného.

## 2.2 Úloha Shh v signalizaci genitálním tkáním

Sonic hedgehog hraje velice důležitou roli ve vývoji polarizovaných struktur nejen končetin, ale v rámci celého těla, proto není překvapením, že i v diferenciaci genitálií má svou nepostradatelnou funkci. Shh je exprimován v kloakálním epitelu, kde se podílí na vzniku genitálního hrbolku i uretrálního epitelu, v němž se Shh signál zachovává i po dobu vyrůstání a specifikace genitálií (Perriton et al., 2002). Vzhledem k tomu, že pohlavní orgány se vyvíjejí ze všech tří embryonálních zárodečných vrstev, vyvstala otázka, jaké tkáně vlastně reagují na přítomnost Shh.

Při kompletní absenci Shh signálu před vytvořením genitálního hrbolku z kloakálních řas se v myších embryích projevuje fenotyp s persistentní kloakou (Perriton et al., 2002; Seifert et al., 2009), což ukazuje, že Shh je nezbytný ke správnému vzniku urorektálního septa (Perriton et al., 2002) a základu pohlavních orgánů. Zablokování exprese Shh až po vytvoření genitálního hrbolku vede k malformacím vyvíjejícího se erektilního orgánu. Tyto malformace se nazývají hypospadie (Lin et al., 2009; Perriton et al., 2002; Seifert et al., 2009) a spočívají v nesprávném vývoji při uzavírání uretrálního epitelu. Projevují se anomálním vyústěním močové trubice na ventrální straně penisu, ať už distálně, nebo ve vážných případech i proximálně. Je to způsobeno tím, že Shh stimuluje přímo ventrální genitální ektoderm k tomu, aby zajistil jeho integritu ke správné invaginaci a uzavření uretrálního epitelu (Perriton et al., 2002). Tento defekt se projevuje i u člověka, ale v dnešní době se dá velmi dobře řešit operativně již během prvních let života (Baskin, 2004).

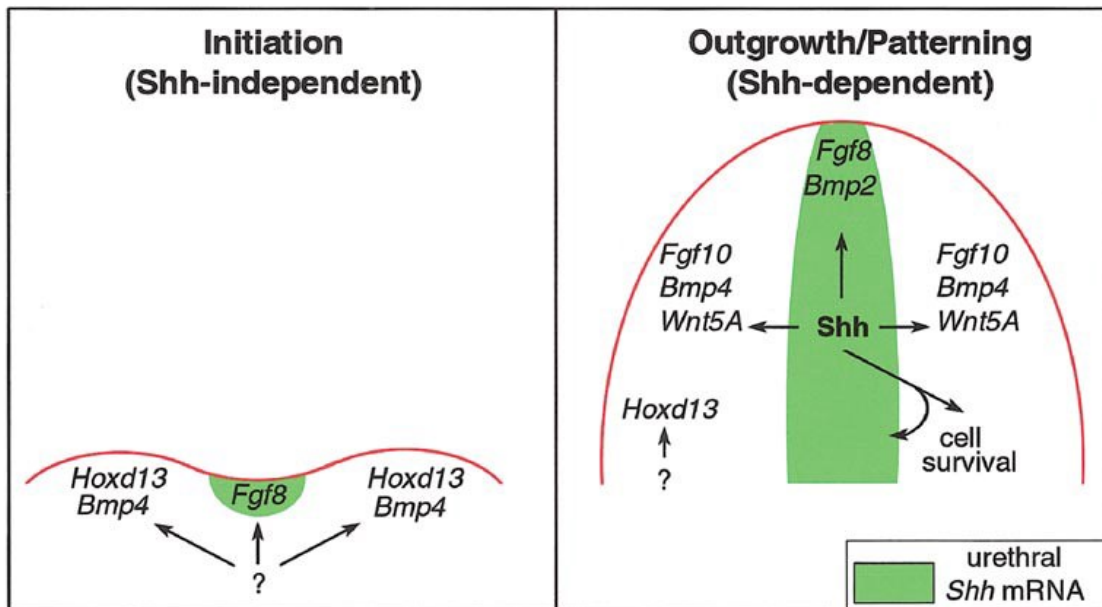
Série pokusů s účelem odhalit, jak na signál Shh reagují embryonální genitální tkáň, spočívala v kondicionální knock-out mutaci genu Smoothed (Smo) za pomoci Cre/rtTA transgenních linií myších embryí (Lin et al., 2009). Smo je faktor potřebný pro spuštění Shh-aktivované signální kaskády (van den Heuvel & Ingham, 1996). Tato knock-out mutace byla postupně provedena ve všech třech zárodečných vrstvách. Při represi Smo v uretrálním epitelu a jiných entodermálních genitálních strukturách nedošlo k žádným vnějším defektům ve vyvinutých pohlavních orgánech (Lin et al., 2009). Inaktivace exprese Smo v ektodermu způsobila ztrátu integrity ventrálního genitálního ektodermu, nedostatečné uzavření močové trubice a hypospadiie (Seifert et al., 2009). V neposlední řadě absence Smo v mezodermu zapříčinila těžké malformace genitálií, znemožnila dokončení jejich vývoje a také indukovala hypospadiie (Lin et al., 2009). Shh totiž v genitálním mezodermu funguje nejen jako signální molekula pro polarizaci, ale také jako stimulant tkáňové proliferace a urychlovač buněčného cyklu (Seifert et al., 2010). Z těchto dat můžeme vyvodit, že pokud dojde k jakémukoliv přerušení Shh signalizace ve vývoji vnějších pohlavních orgánů, dojde k nevyhnutelnému vytvoření odpovídajících defektních fenotypů.

Aktivita Shh v končetině indukuje a udržuje hned několik zpětnovazebných a kaskádových interakcí. V rostoucích pohlavních orgánech tomu není jinak, přestože jak struktury, tak exprimované faktory jsou končetinám pouze analogické. Distantní uretrální epitel se rozkládá na distálním konci genitálního hrbolku, přičemž disponuje podobnou signalizační schopností jako končetinové AER. Exprimuje totiž mimo Shh ještě Fibroblastové růstové faktory (hlavně Fgf8 a Fgf9) a Kostní morfogenní proteiny (hlavně Bmp7) (Yamada et al., 2006), které se podílejí na distálním vyrůstání orgánu.

### **2.3 Shh jakožto polarizující agens v genitáliích**

Stejně jako končetina, i vyvíjející se genitální hrbolok je během růstu a diferenciace polarizován ve třech hlavních osách, avšak s tím rozdílem, že nepárové pohlavní orgány jsou bilaterálně symetrické. Právě tato skutečnost je důvodem, proč je v otázce antero-posteriorní polarizace genitálií analogicky řešena ta dorzo-ventrální.

Pohlavní orgány se od končetin v polarizaci neliší pouze symetrií, ale také rozdílnou závislostí na Shh signálu v postupném vývoji. Zatímco končetiny jsou po ustanovení ZPA neustále polarizovány vlivem Shh, genitální hrbolok má dvě fáze. Nejprve Shh-nezávislou, v níž se



Obr.7: Schéma dvoufázového vývoje genitálního hrbolku. První je Shh-nezávislá (vlevo), kdy dochází k vývoji kloakálních řas, přičemž otazník znázorňuje neznámý faktor spouštějící jejich růst. Druhá je závislá na Shh signálu (vpravo), kde Shh spouští kaskády exprese růstových a diferenačních faktorů, přičemž otazník znázorňuje dosud neznámý faktor spouštějící expresi Hoxd13. Zelená oblast vykresluje expresi Shh. (Perriton et al., 2002), upraveno

zakládají kloakální řasy a postupně se tvoří genitální hrbolek, a potom Shh-závislou, kdy dochází k růstu a diferenciaci budoucích pohlavních orgánů (viz Obr.7).

V rámci experimentů zkoumajících ontogenezi vnějších pohlavních orgánů bylo odhaleno, že genitální hrbolek má svou vlastní polarizující aktivitu, a to transplantací části distálního mezodermu myšího genitálního hrbolku, který byl zbaven ektodermální vrstvy, do končetinového pupene kuřecího embrya. Tím bylo demonstrováno, že genitální mezoderm má slabou polarizující aktivitu (Dolle et al., 1991). Později se ale ukázalo, že pojivové tkáně a erektilní tělesa jsou formována z ventrálního směru genitálního hrbolku. Další výzkum prokázal skutečnost, že právě uretrální ploténka je zodpovědná za dorzo-ventrální polarizaci genitálních tkání, a to transplantací části myšího uretrálního epitelu opět do anteriorní části končetinového pupene kuřecího embrya (Perriton et al., 2002). Výsledkem transplantace byly duplikované autopodní struktury, podobné jako v případě transplantace ZPA-aktivního mezodermu (Tickle et al., 1975), ale také trubicovitá struktura podobná močové trubici i s přilehlým pojivem (Perriton et al., 2002).

V dorzo-ventrální polarizaci savčích pohlavních orgánů je právě invaginace a uzavření uretrální ploténky velice zásadní událostí. Na tomto procesu se podílí hned několik signálních molekul, jejichž exprese je ovlivněna Shh signálem. Nejvíce prominentní jsou

z nich Fgf10, jehož expresi indukuje Shh v mezodermu přiléhajícímu k uretrální ploténce (Haraguchi et al., 2001), dále Hoxa13, který je exprimován přímo v ploténce i v okolním mezodermu, a Bmp7, aktivovaného ve ventrální části genitálního hrbolku. Fgf10 je ligandem ektodermálně exprimovaného FgfR2, přičemž společně stimulují diferenciaci ventrálních tkání a růst předkožky pohlavních orgánů. Při inaktivaci této dráhy dojde k normálnímu vývoji dorzálních genitálních struktur, ale ventrální části jsou silně nedovyvinuté a předkožkové základy ani nevznikají (Petiot et al., 2005). Hoxa13 reguluje expresi Bmp7 ve ventrálním mezodermu, předkožce a uretrální ploténce (E. A. Morgan et al., 2003). Při deleci Hoxa13 dojde ke zbrzdění buněčného cyklu v mezodermu i uretrální ploténce (E. A. Morgan et al., 2003). Další pokusy navíc naznačují důležitou roli Bmp7 v prodlužování močové trubice v rámci růstu pohlavních orgánů (Wu et al., 2009). Pokud je kterýkoliv z těchto faktorů zablokovan, dojde v embryu k vytvoření hypospadie.

I přes tato data je ale skutečná role Shh signálu a uretrální ploténky v polarizaci vyvíjejících se vnějších pohlavních orgánů stále nejasná kvůli funkci Shh jak v polarizaci, tak ve vyrůstání genitálií a je velice těžké tyto role od sebe oddělit. Jak již bylo řečeno, při blokaci Shh signálu dochází ke zpomalení vývoje pohlavních orgánů (Lin et al., 2009; Seifert et al., 2010), a proto jsou výsledky podobných pokusů nejednoznačné.

## **2.4 Ovlivnění polarizace pohlavními hormony**

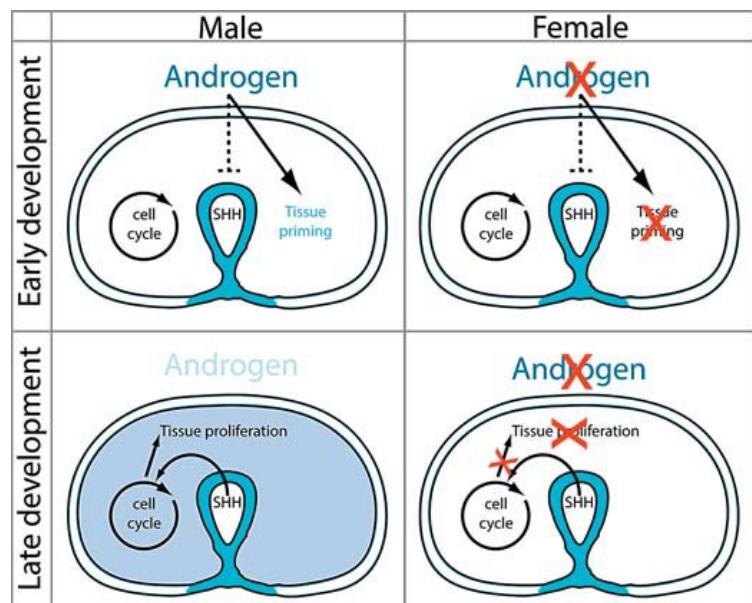
Je všeobecně známo, že androgeny a estrogeny jsou pohlavní steroidní hormony, tedy základní signální molekuly určující pohlaví jedince. Testosteron způsobuje maskulinizaci neboli přeměnu v samce. Estrogen indukuje feminizaci, tedy přeměnu v samici. V této fázi ontogeneze se ale nevyvíjejí žádné zásadní sekundární pohlavní znaky, embryo je pouze stimulováno k vytvoření odpovídajících rozmnožovacích orgánů a žláz. Období citlivosti na pohlavní hormony se nazývá senzitivní perioda, a právě v ní dochází k nejzásadnějším proměnám v genitálním hrbolku.

Androgeny jsou do buněk přijaty androgenními receptory (AR), estrogeny odpovídajícími estrogenními receptory (ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ ), přičemž pronikají přímo do jádra, kde působí jako transkripční faktory. Vzhledem k tomu, že morfologicky jsou rané genitální hrbolky takřka identické a struktury, které se vyvíjejí v obou typech embryí nezávisle na pohlaví jsou si podobné, byla v minulosti přijímána hypotéza, že samičí model je vyvíjen „automaticky“ v nepřítomnosti androgenních hormonů. Tato myšlenka byla vyvrácena výzkumem

provedeným s geneticky modifikovanými embryi myších samic, chovanými pro homozygotně inaktivovaný receptor ER- $\alpha$ . Výsledkem modifikace nebyly pohlavní orgány identické se samičimi, nýbrž prodloužený klitoris, v němž se vyvinuly i pojivové elementy klitoriální kosti (*os clitoris*), běžně se vyskytující spíše v samčích genitáliích coby *os penis* (J. H. Yang et al., 2010). Z tohoto zjištění vyplývá, že při absenci vlivu estrogenů dojde k maskulinizaci klitorisu, tudíž je možné tvrdit, že estrogeny fungují jako supresory reziduálního androgenního signálu a feminizují genitální hrbolk. V opačném případě, pokud dojde k mutaci v androgenním receptoru, dochází k feminizaci samčích pohlavních orgánů, někdy i do té míry, že jsou až nerozeznatelné od těch samičích. Tato mutace se nazývá Tfm (testicular feminization)(J. H. Yang et al., 2010). V dalších případech se může jednat i o slabší defekty spojené s feminizací, jako například hypospadie, nebo zbrzdění penilního růstu a vývoj mikropenisu.

Senzitivita genitálního hrbolku a reakce na androgenní hormony je zajištěna skrze signální dráhu Shh-Gli2 (Miyagawa et al., 2011), kde Gli2 funguje jako mediátor Shh signálu. To znamená, že Shh nemá roli pouze ve vyrůstání a diferenciaci genitálií, ale také se aktivně podílí na maskulinizaci pohlavních orgánů. Tato funkce Shh byla prokázána v experimentech

na klokanech dama (*Macropus eugenii*), jelikož jakožto vačnatci na rozdíl od placentálů plně dokončují svůj vývoj až mimo dělohu v mateřském vaku, kde dochází i k diferenciaci genitálií a pohlavních znaků. Tato mláďata jsou tedy mnohem lépe přístupná manipulaci v době senzitivní periody. Při podání androgenů samičím mláďatům došlo k lehké maskulinizaci a bylo v nich započato uzavírání uretrální ploténky, ale klitoris nebyl prodloužen. Při podání estrogenů samičím mláďatům byl inhibován



Obr.8: Schéma vlivu Shh a androgenních hormonů v klokáním penisu. V raném vývoji je v samčích genitáliích (vlevo nahoře) velká koncentrace androgenů, která připravuje tkáň na proliferaci iniciovanou Shh signálem v pozdějších stádiích a k následnému vývoji penisu (vlevo dole). V raných samičích genitáliích (vpravo nahoře) je vliv androgenů zanedbatelný, tudíž později (vpravo dole) zde neprobíhá tak intenzivní proliferace a dochází k vývoji klitorisu. (Chew et al., 2014)

růst penisu, avšak uzavření uretrální trubice ani testikulární sekrece androgenů nebyly ovlivněny (Y. Chen et al., 2018). Dále byl uskutečněn pokus, v němž byla zjišťována exprese Shh ve stejně modifikovaných mláďatech, který ukázal, že aplikace androgenů způsobí snížení koncentrace Shh v tkáních, zatímco vliv estrogenů koncentraci Shh zvyšuje (Y. Chen et al., 2018; Chew et al., 2014). Z uvedeného experimentu je zřejmé, že zvýšení koncentrace androgenů nejspíše připravuje genitální mezoderm ke zvýšené proliferaci, negativně ovlivňuje expresi Shh, přestože jsou oba faktory nezbytné pro správný vývoj penisu (viz Obr.8).

Signální dráhy zajišťující diferenciaci externích pohlavních orgánů jsou takřka stejně spletité, jako procesy polarizace probíhající v končetinách. Nutno však poznamenat, že vzhledem k multifunkčnosti jednotlivých faktorů působících ve vývoji genitálií je složité přesně vyjádřit jejich jednotlivé interakce a výsledné efekty na konečnou podobu erektivního orgánu, přestože se jedná o poněkud jednodušší strukturu, než je končetina.

### **3 Antero-posteriorní polarizace faryngeálních oblouků**

Faryngeální oblouky jsou od končetin či erektivních těles morfologicky zdánlivě vzdálené, pokud k nim máme referovat jako k tělním extremitám. Tyto oblouky jsou struktury vznikající v hlavové části v oblasti faryngu. U rybovitých čelistnatých obratlovců se skládají z 1. mandibulárního oblouku (dává vznik čelistem), 2. hyoidního oblouku (dává vznik strukturám, které fungují jako podpora pro čelisti, ale také z něj může vzniknout operkulum) a 3.-7. (někdy až 9.) branchiálních oblouků (dávají vznik žábřám). Existují dva typy žaberních aparátů. Prvním jsou vnitřní žábry, tvořené žaberními plátkami nasadajícími na žaberní oblouky, které překrývá operkulum, vytvářející žaberní dutiny. Operkulum je často pohyblivé a napomáhá dýchání. U žraloků a rejnoků se vyvíjejí žaberní paprsky (*gill rays*), chrupavčité struktury vyrůstající přímo z žaberních oblouků, které do žaberních plátek nezasahují. Druhým typem jsou vnější žábry, pohyblivé keříčkovité výrůstky s jednou hlavní větví poseté žaberními filamenti. I u živočichů s vnějšími žábry se může vyvinout operkulum (např.: u žab, larvy mají vnější žábry přerostlé operkulem), ale u většiny ostatních (bichir, ocasatí obojživelníci, bahňáci, červoři) operkulum takto nepřerůstá.

U suchozemských skupin obratlovců se dýchání realizuje za pomoci plicního aparátu na vzdušném prostředí, tudíž jsou zde branchiální oblouky v rámci vývoje přímo přerůstány operkulem vymezující dutinu (cervikální sinus) (Richardson et al., 2012). Operkulum u

suchozemských obratlovců (operkulární fold) totiž srůstá s ektodermem branchiálních oblouků a uzavírá tak cervikální sinus. Může se ale stát, že nesroste dokonale a zanechává externí otvor v krční oblasti (*fistula*). V rámci pokusů na kuřecích embryích byla v oblasti faryngeálních oblouků ukázána exprese Shh, Fgf8 a dalších molekul podílejících se na polarizaci tělních extremit (Wall & Hogan, 1995), což prokazuje určitou podobnost s mechanismy polarizace v ostatních již zmíněných strukturách.

### **3.1 Branchiální signalizační centra**

Podobně jako ZPA v končetinách, nebo uretrální ploténka v externích genitáliích, i v branchiálních obloucích se nachází oblast se silnou polarizující aktivitou, která zajišťuje diferenciaci těchto struktur v rámci antero-posteriorní osy. Je jí GAER (*gill arch epithelial ridge*, žaberní epiteliální lišta; dříve PEM, *posterior ectodermal margin*), vyskytující se v hyoidním a branchiálních (žaberních) obloucích, která je funkcí podobná končetinovému ZPA, ale umístěním se podobá spíše AER. GAER se totiž rozprostírá na laterální a posteriorní straně oblouků, kde zajišťuje právě laterální expanzi, jejich distální prodlužování a antero-posteriorní polarizaci (Gillis & Hall, 2016). Podobnost se ZPA spočívá v tom, že GAER je také zóna intenzivní exprese Shh signálu (Gillis & Hall, 2016), ale zároveň se zde exprimuje Fgf8 (Gillis et al., 2009), zodpovědné za vyrůstání žaberních oblouků a následnou diferenciaci žaberních filament. Mimo tyto zásadní signalizační molekuly jsou v GAER exprimovány i faktory Bmp (Bmp4 a Bmp7), což bylo prokázáno v in situ hybridizačních pokusech na kuřecích embryích (Wall & Hogan, 1995). Shh a Fgf8 zde tvoří pozitivní zpětnou vazbu podobnou té, kterou nalézáme v končetině mezi Shh a Fgf4. Tato analogie končetinové polarizační hypotézy je zároveň podpořena pokusem, v němž byla kyselina retinová ektopicky aplikována na anteriorní část branchiálních oblouků embryí rejnoků. Vlivem této stimulace kyselinou retinovou u nich byla indukována exprese Shh v anteriorní části branchiálních oblouků a došlo k zrcadlovým antero-posteriorním duplikacím (Gillis et al., 2009), analogickým těm v končetině (Saunders & Gasseling, 1968, podle Maccabe et al., 1973).

### **3.2 Shh coby polarizující agens v branchiálních strukturách**

Jak již bylo řečeno, zdrojem Shh signálu v branchiálních obloucích je GAER. Tento signál v branchiálních strukturách zajišťuje typické posteriorní zakřivení oblouků. V žaberních obloucích chrupavčitých ryb (žraloci, rejnoci) se ze Shh-dependentního mezenchymu tvoří

chrupavčité žaberní paprsky (*branchial rays*), což bylo ukázáno na histologické analýze CM-Dil-pozitivních branchiálních chondrocytů rejnočích embryí, do jejichž vyvíjejících se žaberních oblouků byl ještě před iniciací žaberních paprsků injekčně vpraven CM-Dil marker (Gillis & Hall, 2016). Při blokaci Shh aplikací jeho antagonisty cyklopaminu (J. K. Chen et al., 2002) byl počet žaberních paprsků na oblouk výrazně snížen kvůli nižší Shh-mediované buněčné proliferaci (Gillis & Hall, 2016). U kuřecího embrya aplikace cyklopaminu způsobí redukci těchto oblouků a zvýší výskyt fagocytujících buněk (Kolesova et al., 2007). Vliv Shh signálu je ale nejvíce znatelný nejspíše při růstu hyoidního oblouku při uzavírání cervikálního sinu operkulem (Richardson et al., 2012), kde je iniciován masivní posteriorní vývoj nutný ke správnému překrytí branchiálních oblouků (Wall & Hogan, 1995).

Výzkum v oblasti antero-posteriorní polarizace branchiálních oblouků a z nich derivovaných struktur je zatím stále ještě v rané fázi. Je poněkud skličující, že je k tomuto tématu velice málo relevantních informací, ale zároveň tato nevědomost poskytuje možnosti nových objevů, které mohou do budoucna změnit pohled na tuto problematiku.

#### **4. Závěr**

Molekulární mechanismy růstu a diferenciací tělních extremit jsou poměrně složitou problematikou, která obsahuje mnoho jednotlivých elementů, spletitých propojení mezi nimi a takřka bezpočet signalizačních kaskád, které se často odehrávají zároveň. I přes komplexitu těchto procesů se jedná o velice hluboce zakořeněný systém, jehož paralely můžeme sledovat při vývoji napříč všemi polarizovanými tělními extremitami, od těch nejjednodušších, po ty nejsložitější.

S těmito dostupnými daty se zde nabízí zmínit dvě hypotézy ohledně vzniku párových končetin. První říká, že původ končetin spočívá v lokálním zachování laterálního ploutevního lemu, který se údajně táhl po obou laterálních tělních plochách prehistorických ryb (*fin fold hypothesis*)(Balfour, 1881). Druhá stanovuje původ párových končetin jakožto derivátů branchiálních/žaberních oblouků (*gill arch hypothesis*) (Gegenbaur, 1878, podle Gillis & Hall, 2016). Obě tyto hypotézy jsou plauzibilní, ale pro plné podpoření kterékoliv z nich chybí potřebná paleontologická data (Coates, 2003). Je však zřejmé, že podobnost antero-posteriorních polarizačních procesů v končetině, branchiálních obloucích i vnějších genitáliích s velkou pravděpodobností nemusí být náhodná a dala by se považovat za sdílenou, hluboce ancestrální homologii (*deep/process homology*)(Shubin et al., 2009).

Zbývá jen otázka, zda se jedná o kontinuální evoluci rozdílných extremit ke stejným základním mechanismům, nebo zda jejich původ opravdu vězí v jakési původní kořenové struktuře (Tarazona et al., 2019)?

Popis polarizačních vývojových procesů je v jednotlivých extremitách morfologicky odlišný, ale z molekulárního hlediska jsou si tyto mechanismy podobné, a to jak v nejprozkoumanější polarizované struktuře, končetině, přes vývoj ovlivněný pohlavními hormony v externích pohlavních orgánech, až po enigmatické branchiální oblouky. Ve všech těchto extremitách se uplatňuje vliv jedné polarizační molekuly, která je mediátorem asymetrické diferenciační aktivity, Sonic hedgehog. Právě tato molekula, vyskytující se ve vývojových dějích všech zde popsaných struktur, a díky níž jsou spouštěny početné děje stimulující tkáň ke specifickému vývoji a transformaci, je zodpovědná za fenomén antero-posteriorně asymetricky polarizovaných částí těl všech obratlovců.

## Reference

- Akimenko, M.-A., & Ekker, M. (1995). Anterior Duplication of the Sonic hedgehog Expression Pattern in the Pectoral Fin Buds of Zebrafish Treated with Retinoic Acid. *Developmental Biology*, 170(1), 243–247. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1211>
- Bai, C. B., Auerbach, W., Lee, J. S., Stephen, D., & Joyner, A. L. (2002). *Gli2*, but not *Gli1*, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*, 129(20), 4753–4761. <https://doi.org/10.1242/dev.129.20.4753>
- Balfour, F. M. (1881). On the Development of the Skeleton of the Paired Fins of Elasmobranchii, considered in Relation to its Bearings on the Nature of the Limbs of the Vertebrata. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 49(3), 656–670. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1881.tb01323.x>
- Baskin, L. S. (2004). Hypospadias. In L. S. Baskin (Ed.), *Hypospadias and Genital Development* (Roč. 545, s. 3–22). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8995-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8995-6_1)

- Briskie, J. V., & Montgomerie, R. (2001). Efficient copulation and the evolutionary loss of the avian intromittent organ. *Journal of Avian Biology*, *32*(2), 184–187. <https://doi.org/10.1034/j.1600-048X.2001.320212.x>
- Busby, L., Aceituno, C., McQueen, C., Rich, C. A., Ros, M. A., & Towers, M. (2020). Sonic hedgehog specifies flight feather positional information in avian wings. *Development*, *147*(9), dev188821. <https://doi.org/10.1242/dev.188821>
- Coates, M. I. (2003). The evolution of paired fins. *Theory in Biosciences*, *122*(2–3), 266–287. <https://doi.org/10.1007/s12064-003-0057-4>
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A., & Martin, G. R. (1996). Roles for FGF8 in the Induction, Initiation, and Maintenance of Chick Limb Development. *Cell*, *84*(1), 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80999-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80999-X)
- Dahn, R. D., Davis, M. C., Pappano, W. N., & Shubin, N. H. (2007). Sonic hedgehog function in chondrichthyan fins and the evolution of appendage patterning. *Nature*, *445*(7125), 311–314. <https://doi.org/10.1038/nature05436>
- Dolle, P., Izpisua-Belmonte, J. C., Brown, J. M., Tickle, C., & Duboule, D. (1991). HOX-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes & Development*, *5*(10), 1767–1776. <https://doi.org/10.1101/gad.5.10.1767>
- Dollé, P., Izpisúa-Belmonte, J.-C., Falkenstein, H., Renucci, A., & Duboule, D. (1989). Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homoeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature*, *342*(6251), 767–772. <https://doi.org/10.1038/342767a0>
- Drossopoulou, G., Lewis, K. E., Sanz-Ezquerro, J. J., Nikbakht, N., McMahon, A. P., Hofmann, C., & Tickle, C. (2000). A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development*, *127*(7), 1337.

- Duprez, D., Fournier-Thibault, C., & Le Douarin, N. (1998). Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development*, *125*(3), 495–505.  
<https://doi.org/10.1242/dev.125.3.495>
- Duprez, D., Lapointe, F., Edom-Vovard, F., Kostakopoulou, K., & Robson, L. (1999). Sonic Hedgehog (SHH) specifies muscle pattern at tissue and cellular chick level, in the chick limb bud. *Mechanisms of Development*, *82*(1–2), 151–163. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00040-4)
- Fernandez-Teran, M., & Ros, M. A. (2008). The Apical Ectodermal Ridge: Morphological aspects and signaling pathways. *The International Journal of Developmental Biology*, *52*(7), 857–871.  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.072416mf>
- Francis, P. H., Richardson, M. K., Brickell, P. M., & Tickle, C. (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development*, *120*(1), 209.
- 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), 5720–5724. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810959106>
- Gillis, J. A., & Hall, B. K. (2016). A shared role for sonic hedgehog signalling in patterning chondrichthyan gill arch appendages and tetrapod limbs. *Development*, *143*(8), 1313–1317.  
<https://doi.org/10.1242/dev.133884>
- Gritli-Linde, A., Lewis, P., McMahon, A. P., & Linde, A. (2001). The Whereabouts of a Morphogen: Direct Evidence for Short- and Graded Long-Range Activity of Hedgehog Signaling Peptides. *Developmental Biology*, *236*(2), 364–386. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0336>
- Gurdon, J. B., Mitchell, A., & Mahony, D. (1995). Direct and continuous assessment by cells of their position in a morphogen gradient. *Nature*, *376*(6540), 520–521.  
<https://doi.org/10.1038/376520a0>

- Haraguchi, R., Mo, R., Hui, C., Motoyama, J., Makino, S., Shiroishi, T., Gaffield, W., & Yamada, G. (2001). Unique functions of Sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development*, *128*(21), 4241–4250. <https://doi.org/10.1242/dev.128.21.4241>
- Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M., & Harland, R. M. (1998). The Xenopus Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities. *Molecular Cell*, *1*(5), 673–683. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80067-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80067-2)
- Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T., & Beachy, P. A. (2002). Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(22), 14071–14076. <https://doi.org/10.1073/pnas.182542899>
- Chen, Y., Yu, H., Pask, A. J., Fujiyama, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Shaw, G., & Renfree, M. B. (2018). Hormone-responsive genes in the SHH and WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathways influence urethral closure and phallus growth<sup>†</sup>. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy117>
- Chew, K. Y., Pask, A. J., Hickford, D., Shaw, G., & Renfree, M. B. (2014). A Dual Role for SHH during Phallus Development in a Marsupial. *Sexual Development*, *8*(4), 166–177. <https://doi.org/10.1159/000357927>
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., & Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, *383*(6599), 407–413. <https://doi.org/10.1038/383407a0>
- Izpisúa-Belmonte, J.-C., Tickle, C., Dollé, P., Wolpert, L., & Duboule, D. (1991). Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development. *Nature*, *350*(6319), 585–589. <https://doi.org/10.1038/350585a0>
- Khokha, M. K., Hsu, D., Brunet, L. J., Dionne, M. S., & Harland, R. M. (2003). Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nature Genetics*, *34*(3), 303–307. <https://doi.org/10.1038/ng1178>

- Kolesova, H., Roelink, H., & Grim, M. (2007). Sonic hedgehog in avian branchial arch development. *The FASEB Journal*, 21(6). <https://doi.org/10.1096/fasebj.21.6.LB73-a>
- Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A., & Tabin, C. (1994). Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell*, 79(6), 993–1003. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90030-2)
- Lewandoski, M., Sun, X., & Martin, G. R. (2000). Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nature Genetics*, 26(4), 460–463. <https://doi.org/10.1038/82609>
- Lewis, P. M., Dunn, M. P., McMahon, J. A., Logan, M., Martin, J. F., St-Jacques, B., & McMahon, A. P. (2001). Cholesterol Modification of Sonic Hedgehog Is Required for Long-Range Signaling Activity and Effective Modulation of Signaling by Ptc1. *Cell*, 105(5), 599–612. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00369-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00369-5)
- Lin, C., Yin, Y., Veith, G. M., Fisher, A. V., Long, F., & Ma, L. (2009). Temporal and spatial dissection of Shh signaling in genital tubercle development. *Development*, 136(23), 3959–3967. <https://doi.org/10.1242/dev.039768>
- Litingtung, Y., Dahn, R. D., Li, Y., Fallon, J. F., & Chiang, C. (2002). Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*, 418(6901), 979–983. <https://doi.org/10.1038/nature01033>
- Maccabe, A. B., Gasseling, M. T., & Saunders, J. W. (1973). Spatiotemporal distribution of mechanisms that control outgrowth and anteroposterior polarization of the limb bud in the chick embryo. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2, 1–12. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(73\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0047-6374(73)90002-X)
- Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M., & Tabin, C. J. (1996). Biochemical evidence that Patched is the Hedgehog receptor. *Nature*, 384(6605), 176–179. <https://doi.org/10.1038/384176a0>

- Marigo, V., Johnson, R. L., Vortkamp, A., & Tabin, C. J. (1996). Sonic hedgehog Differentially Regulates Expression of Gli and Gli3 during Limb Development. *Developmental Biology*, *180*(1), 273–283.  
<https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0300>
- Marigo, V., Scott, M. P., Johnson, R. L., Goodrich, L. V., & Tabin, C. J. (1996). Conservation in hedgehog signaling: Induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development*, *122*(4), 1225.
- Miyagawa, S., Matsumaru, D., Murashima, A., Omori, A., Satoh, Y., Haraguchi, R., Motoyama, J., Iguchi, T., Nakagata, N., Hui, C., & Yamada, G. (2011). The Role of Sonic Hedgehog-Gli2 Pathway in the Masculinization of External Genitalia. *Endocrinology*, *152*(7), 2894–2903.  
<https://doi.org/10.1210/en.2011-0263>
- Moon, A. M., & Capecchi, M. R. (2000). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nature Genetics*, *26*(4), 455–459. <https://doi.org/10.1038/82601>
- Morgan, B. A., Izpisua-Belmonte, J.-C., Duboule, D., & Tabin, C. J. (1992). Targeted misexpression of Hox-4.6 in the avian limb bud causes apparent homeotic transformations. *Nature*, *358*(6383), 236–239. <https://doi.org/10.1038/358236a0>
- Morgan, B. A., & Tabin, C. (1994). Hox genes and growth: Early and late roles in limb bud morphogenesis. *Development*, *1994*(Supplement), 181–186.  
<https://doi.org/10.1242/dev.1994.Supplement.181>
- Morgan, E. A., Nguyen, S. B., Scott, V., & Stadler, H. S. (2003). Loss of Bmp7 and Fgf8 signaling in Hoxa13-mutant mice causes hypospadias. *Development*, *130*(14), 3095–3109.  
<https://doi.org/10.1242/dev.00530>
- Murakami, R., & Mizuno, T. (1986). Proximal—Distal sequence of development of the skeletal tissues in the penis of rat and the inductive effect of epithelium. *Development*, *92*(1), 133–143.  
<https://doi.org/10.1242/dev.92.1.133>

- Murone, M., Rosenthal, A., & de Sauvage, F. J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the Patched–Smoothed receptor complex. *Current Biology*, *9*(2), 76–84. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80018-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80018-9)
- Nelson, C. E., Morgan, B. A., Burke, A. C., Laufer, E., DiMambro, E., Murtaugh, L. C., Gonzales, E., Tessarollo, L., Parada, L. F., & Tabin, C. (1996). Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development*, *122*(5), 1449–1466. <https://doi.org/10.1242/dev.122.5.1449>
- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G. R., & Tickle, C. (1994). A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature*, *371*(6498), 609–612. <https://doi.org/10.1038/371609a0>
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., & Martin, G. R. (1993). FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell*, *75*(3), 579–587. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90391-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90391-3)
- Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohshima, K., Aoki, Y., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S., & Saito, T. (1991). Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature*, *350*(6313), 83–86. <https://doi.org/10.1038/350083a0>
- Parr, B. A., & McMahon, A. P. (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D–V and A–P axes of mouse limb. *Nature*, *374*(6520), 350–353. <https://doi.org/10.1038/374350a0>
- Perriton, C. L., Powles, N., Chiang, C., Maconochie, M. K., & Cohn, M. J. (2002). Sonic hedgehog Signaling from the Urethral Epithelium Controls External Genital Development. *Developmental Biology*, *247*(1), 26–46. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0668>
- Petiot, A., Perriton, C. L., Dickson, C., & Cohn, M. J. (2005). Development of the mammalian urethra is controlled by Fgf2-IIIb. *Development*, *132*(10), 2441–2450. <https://doi.org/10.1242/dev.01778>

- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., & Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, *75*(7), 1401–1416. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90626-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90626-2)
- Richardson, J., Shono, T., Okabe, M., & Graham, A. (2012). The presence of an embryonic opercular flap in amniotes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1727), 224–229. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0740>
- Ros, M. A., Dahn, R. D., Fernandez-Teran, M., Rashka, K., Caruccio, N. C., Hasso, S. M., Bitgood, J. J., Lancman, J. J., & Fallon, J. F. (2003). The chick *oligozeugodactyly* (*ozd*) mutant lacks sonic hedgehog function in the limb. *Development*, *130*(3), 527. <https://doi.org/10.1242/dev.00245>
- Sanger, T. J., Gredler, M. L., & Cohn, M. J. (2015). Resurrecting embryos of the tuatara, *Sphenodon punctatus*, to resolve vertebrate phallus evolution. *Biology Letters*, *11*(10), 20150694. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0694>
- Saunders, J. W., Gasseling, M. T., & Saunders, L. C. (1962). Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Developmental Biology*, *5*(1), 147–178. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(62\)90008-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(62)90008-8)
- Seifert, A. W., Bouldin, C. M., Choi, K.-S., Harfe, B. D., & Cohn, M. J. (2009). Multiphasic and tissue-specific roles of sonic hedgehog in cloacal septation and external genitalia development. *Development*, *136*(23), 3949–3957. <https://doi.org/10.1242/dev.042291>
- Seifert, A. W., Harfe, B. D., & Cohn, M. J. (2008). Cell lineage analysis demonstrates an endodermal origin of the distal urethra and perineum. *Developmental Biology*, *318*(1), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.017>
- Seifert, A. W., Zheng, Z., Ormerod, B. K., & Cohn, M. J. (2010). Sonic hedgehog controls growth of external genitalia by regulating cell cycle kinetics. *Nature Communications*, *1*(1), 23. <https://doi.org/10.1038/ncomms1020>
- Shubin, N., Tabin, C., & Carroll, S. (2009). Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature*, *457*(7231), 818–823. <https://doi.org/10.1038/nature07891>

- Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J. E., de Sauvage, F., & Rosenthal, A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*, *384*(6605), 129–134. <https://doi.org/10.1038/384129a0>
- Summerbell, D. (1974). Interaction between the proximo-distal and antero-posterior co-ordinates of positional value during the specification of positional information in the early development of the chick limb-bud. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *32*(1), 227.
- Tarazona, O. A., Lopez, D. H., Slota, L. A., & Cohn, M. J. (2019). Evolution of limb development in cephalopod mollusks. *ELife*, *8*, e43828. <https://doi.org/10.7554/eLife.43828>
- Tickle, C. (1981). The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing. *Nature*, *289*(5795), 295–298. <https://doi.org/10.1038/289295a0>
- Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L., & Lee, J. (1982). Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature*, *296*(5857), 564–566. <https://doi.org/10.1038/296564a0>
- Tickle, C., Lee, J., & Eichele, G. (1985). A quantitative analysis of the effect of all-trans-retinoic acid on the pattern of chick wing development. *Developmental Biology*, *109*(1), 82–95. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90348-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90348-3)
- Tickle, C., Shellswell, G., Crawley, A., & Wolpert, L. (1976). Positional signalling by mouse limb polarising region in the chick wing bud. *Nature*, *259*(5542), 396–397. <https://doi.org/10.1038/259396a0>
- Tickle, C., Summerbell, D., & Wolpert, L. (1975). Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature*, *254*(5497), 199–202. <https://doi.org/10.1038/254199a0>
- Towers, M., Mahood, R., Yin, Y., & Tickle, C. (2008). Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature*, *452*(7189), 882–886. <https://doi.org/10.1038/nature06718>

- Tsumaki, N., & Yoshikawa, H. (2005). The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(3), 279–285.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.04.001>
- Tulenko, F. J., Massey, J. L., Holmquist, E., Kigundu, G., Thomas, S., Smith, S. M. E., Mazan, S., & Davis, M. C. (2017). Fin-fold development in paddlefish and catshark and implications for the evolution of the autopod. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1855), 20162780. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2780>
- van den Heuvel, M., & Ingham, P. W. (1996). Smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature*, 382(6591), 547–551.  
<https://doi.org/10.1038/382547a0>
- Vargas, A. O., & Fallon, J. F. (2005). The digits of the wing of birds are 1, 2, and 3. A review. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 304B(3), 206–219.  
<https://doi.org/10.1002/jez.b.21051>
- Wall, N. A., & Hogan, B. L. M. (1995). Expression of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), fibroblast growth factor-8 (FGF-8) and sonic hedgehog (SHH) during branchial arch development in the chick. *Mechanisms of Development*, 53(3), 383–392. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(95\)00453-X](https://doi.org/10.1016/0925-4773(95)00453-X)
- Wanek, N., Gardiner, D. M., Muneoka, K., & Bryant, S. V. (1991a). Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. *Nature*, 350(6313), 81–83.  
<https://doi.org/10.1038/350081a0>
- Wanek, N., Gardiner, D. M., Muneoka, K., & Bryant, S. V. (1991b). Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. *Nature*, 350(6313), 81–83.  
<https://doi.org/10.1038/350081a0>
- Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *Journal of Theoretical Biology*, 25(1), 1–47. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(69\)80016-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(69)80016-0)

- Wu, X., Ferrara, C., Shapiro, E., & Grishina, I. (2009). Bmp7 expression and null phenotype in the urogenital system suggest a role in re-organization of the urethral epithelium. *Gene Expression Patterns*, 9(4), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.12.005>
- Yamada, G., Suzuki, K., Haraguchi, R., Miyagawa, S., Satoh, Y., Kamimura, M., Nakagata, N., Kataoka, H., Kuroiwa, A., & Chen, Y. (2006). Molecular genetic cascades for external genitalia formation: An emerging organogenesis program. *Developmental Dynamics*, 235(7), 1738–1752. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20807>
- Yang, J., Andre, P., Ye, L., & Yang, Y.-Z. (2015). The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *International Journal of Oral Science*, 7(2), 73–79. <https://doi.org/10.1038/ijos.2015.14>
- Yang, J. H., Menshenina, J., Cunha, G. R., Place, N., & Baskin, L. S. (2010). Morphology of Mouse External Genitalia: Implications for a Role of Estrogen in Sexual Dimorphism of the Mouse Genital Tubercle. *Journal of Urology*, 184(4S), 1604–1609. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.03.079>
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P. T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A., & Tickle, C. (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development*, 124(21), 4393.
- Zakany, J., & Duboule, D. (2007). The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17(4), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.05.011>
- Zeng, X., Goetz, J. A., Suber, L. M., Scott, W. J., Schreiner, C. M., & Robbins, D. J. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature*, 411(6838), 716–720. <https://doi.org/10.1038/35079648>
- Zúñiga, A., Haramis, A.-P. G., McMahon, A. P., & Zeller, R. (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature*, 401(6753), 598–602. <https://doi.org/10.1038/44157>

## **Sekundární reference**

\*J. W. Saunders, Jr. and M. T. Gasseling (1968). Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry, in R. Fleischmajer and R. E. Billingham (Eds.), Epithelial-Mesenchymal interactions in Development, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 78-97

\*Gegenbaur, C. (1878). Elements of comparative anatomy. Macmillan and Company.