

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli“.

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**Katedra Genetiky a Mikrobiologie**

**GRADIENT REFRAKČNÍHO INDEXU V OKU  
ČTYŘHRANKY: ANALÝZA EXPRESE  
SPECIFICKÝCH GENŮ**

*Bc. Kristýna Jonášová*



Praha 2008

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Zbyněk Kozmík, Csc.**

Prohlašuji, že práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením školitele RNDr. Zbyňka Kozmíka, Csc.

V Praze dne 1. 5. 2008

Bc. Kristýna Jonášová

Několik řádků samozřejmě nestačí k poděkování za skvělý čas, který jsem strávila na Oddělení transkripční regulace. Chtěla bych přesto i takto vyjádřit své díky jmenovitě RNDr. Zbyňkovi Kozmíkovi, Csc., vedoucímu mé diplomové práce, Mgr. Janě Růžičkové, Ing. Jitce Láchové, Veronice Noskové a všem dalším kolegům a přátelům z laboratoře, za veškerou pomoc, které se mi od nich dostalo a skvělou atmosféru, kterou kolem sebe neustále šíří. Stejně tak bych chtěla poděkovat mým blízkým za pochopení a podporu během studií.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Mirkovi Hylišovi za pomoc s elektronovou mikroskopií, Davidovi Goliášovi, PhD. za vlastní měření rentgenové difrakce a Bc. Michaela Rothové, MUDr. Renatě Peterkové, PhD. a Zbyňkovi Likovskému, PhD. za cenné rady a chemikálie pro histologická barvení.

Práce vznikla za finanční podpory grantů AVOZ50520514 Akademie věd ČR a 1M6837805002 Centra pro aplikovanou genomiku.

# 1. Abstract

## **Refractive index gradient in the cubozoan eye: specific gene expression analysis**

Lenses are spread through animal kingdom as an improvement of different eye types. Despite conservation of some key regulators and shared use of photopigment opsin, eyes and their lenses develop by variable mechanisms impeaching their monophyletic origin. *Tripedalia cystophora* (*T. c.*), a cubozoan jellyfish, is an emerging new model for studying eye evolution. The presence of advanced lens-containing eyes (firstly incident within metazoans in this phylum of *Cnidaria*), the two types of lesser eyes, the use of *pax* gene and vertebrate type of phototransduction cascade for eye establishment make this jellyfish an useful tool for comparing eye development and different evolutionary strategies.

We focused on the lenses of *T.c.* and studied formation of their refractive index gradient to reveal its mechanism. Using new antibodies raised against J1 and J2 crystallins (proteins of the *T. c.* lens), TEM and histology we found that graded refractive index is of protein origin and formed by unequal accumulation of proteins (particularly J1 and J2 crystallins) in different layers of the lens. We have shown that J1 crystallin occurs also in the lesser eyes (*ocelli*) suggesting how the lens mass can evolved. The synthesis of J2 crystallin in lens development has been examined. Furthermore we have prepared J2 crystallin fused to GFP and described the cellular localization of this novel crystallin. The experiment confirmed its cytoplasmatic localization and thus a biologically sensible expression regarding its role as a crystallin. Finally we have determined the expression of several interesting genes using RNA *in situ* hybridization. For example, we determined the expression of selenoprotein O, one of many genes lost in insects or nematodes but conserved among *T. c.* and vertebrates. RNA *in situ* hybridization for MITF, transcription factor crucial for eye development, revealed its presence in the eyes of *Tripedalia cystophora*.

In summary, it seems that *T. c.* and vertebrate share much more than a fine lens within an eye. Recent studies, this one included, shed light on the conservation of cnidarian and vertebrate genomes and support the hypothesis of the maintenance of early evolving gene set in these two lineages and massive loss in the others, such as of insect or nematodes.

Key words: eye, lens, J1 crystallin, J2 crystallin, evolution, refractive index gradient, gene set conservation

Klíčová slova: oko, čočka, J1 krystalin, J2 krystalin, evoluce, gradient refrakčního indexu, konzervace genových sad

## 2. Obsah

1. Abstract .....	4
2. Obsah .....	5
3. Zkratky použité v textu .....	7
4. Úvod.....	8
5. Přehled literatury .....	10
5.1 Zrak jako základní smysl .....	10
5.1.1 Čočka a rohovka: zdokonalení oka .....	10
5.1.2 Čočka a rohovka: determinace prostředí.....	12
5.2 Proteiny čočky: krystaliny a „ <i>gene sharing</i> “ strategie .....	13
5.3 Jeden foton pigment, mnoho krystalinů: oko jednou nebo vícekrát? .....	14
5.4 Krystaliny <i>Tripedalia cystophora</i> .....	15
5.5 <i>Tripedalia cystophora</i> jako modelový organismus pro studium evoluce očí ..	17
5.5.1 Taxonomie a životní cyklus .....	17
5.5.2 Morfologie vizuálních orgánů: rhopaliium .....	19
5.5.2.1 Pit a slit .....	21
5.5.2.2 Komplexní oči s čočkou .....	22
5.5.3 Nervová soustava rhopalia .....	23
5.6 Genomy žahavců: nečekaná pokročilost a/nebo zachování jinde ztraceného? ..	25
6. Materiál a metody .....	27
6.1 Materiál .....	27
6.2 Základní roztoky a média .....	28
6.3 Metody .....	28
6.3.1 Založení kultur, sběr vzorků a kultivace <i>Tripedalia cystophora</i> .....	28
6.3.2 Příprava krmiva – kultivace nauplií .....	29
6.3.3 Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii .....	29
6.3.4 Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii .....	30
6.3.5 Příprava homogenizátů z čoček a celých rhopalií pro SDS PAGE .....	30
6.3.6 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	31
6.3.7 Western blot s chemiluminiscenční detekcí .....	32
6.3.8 Příprava králíčích polyklonálních protilátek .....	33
6.3.8.1 Příprava expresního vektoru .....	34
6.3.8.2 Expres rekombinantního proteinu v <i>E. coli</i> BL21(DE3)RIPL.....	38
6.3.8.3 Afinitní purifikace rekombinantního proteinu s 6xHis kotvou .....	38
6.3.8.4 Imunizace králíka .....	39
6.3.9 Příprava mrazových řezů pro IHC (imunohistochemie) a RNA ISH.....	40
6.3.10 IHC – imunohistochemie na mrazových řezech .....	40
6.3.11 IHC na blocích tkáně či celých jedincích .....	42
6.3.12 RNA <i>in situ</i> hybridizace .....	43
6.3.12.1 Příprava plazmidu pro syntézu próby na RNA <i>in situ</i> hybridizaci...	43
6.3.12.2 Syntéza próby pro RNA <i>in situ</i> hybridizaci .....	44
6.3.12.3 RNA <i>in situ</i> hybridizace na mrazových řezech .....	44
6.3.13 RNA <i>in situ</i> hybridizace na blocích tkáně či celých jedincích .....	46
6.3.14 Charakterizace buněčné lokalizace proteinu translační fúzí s GFP .....	47
6.3.14.1 Příprava COS7 buněk na skla ve 24 jamkových destičkách.....	47
6.3.14.2 FUGENE transfekce buněk na sklech v 24 jamkových destičkách...	48
6.3.15 Histologická barvení .....	48
6.3.16 XRD study .....	49
7. Výsledky .....	50

7.1	Krystalická fáze v centru čoček: rentgenová difrakce .....	50
7.2	Elektronmikroskopická analýza.....	51
7.2.1	Skenovací elektronová mikroskopie rhopalí .....	51
7.2.2	Transmisní elektronová mikroskopie .....	51
7.2.2.1	TEM: gradient v čočce.....	51
7.2.2.2	TEM: vznik gradientu elektronové hustoty ve vývoji čočky.....	52
7.2.2.3	TEM: charakterizace pigmentovaného fotoreceptoru .....	53
7.3	Příprava protilátek proti J1 a J2 krystalinům .....	54
7.4	Proteinová charakterizace čoček.....	55
7.5	Lokalizace J1 a J2 krystalinů připravenými protilátkami.....	56
7.5.1	J1 krystalin .....	56
7.5.2	J2 krystalin .....	56
7.5.3	Přítomnost krystalinů v menších očích rhopalía: pitu a slitu .....	59
7.5.4	Buněčná lokalizace J2 krystalinu .....	59
7.6	Histologická barvení .....	60
7.6.1	Histologie: proteiny v čočkách komplexních očí.....	61
7.6.2	Histologická charakteristika pitu a slitu .....	62
7.7	Studium exprese vybraných genů: konzervace genů obratlovců a žahavců....	63
7.7.1	MITF .....	63
7.7.2	RFamid prekurzor .....	64
7.7.3	Selenoprotein O .....	65
8.	Diskuze .....	67
8.1	Gradient refrakčního indexu v čočce.....	67
8.2	Čtyři odlišné typy očí v rámci jednoho smyslového orgánu .....	69
8.3	Genové sady žahavců a obratlovců: překvapivě blízko.....	71
9.	Souhrn.....	73
10.	Seznam citované literatury.....	74
11.	Přílohy.....	78

### 3. Zkratky použité v textu

AP.....	alkalická fosfatáza
CMV.....	cytomegalovirus
CNS.....	centrální nervová soustava
DIG.....	digoxigenin
ECM.....	extracelulární matrix (vněbuněčná hmota)
EST.....	<i>expressed sequence tag</i> – část kódující sekvence genu
EtOH.....	ethanol
GFP.....	<i>green fluorescent protein</i> – zelený fluorescenční protein
GST.....	glutathion-S-trasferáza
HRP.....	<i>horseradish peroxidase</i> – křenová peroxidáza
IHC.....	imunohistochemie (imunohistochemická detekce antigenů protilátkami)
IPA.....	isopropanol
IPTG.....	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktozid
J1, J2.....	J1 krystalin, J2 krystalin
MeOH.....	methanol
NBT/BCIP.....	nitroblue (modř) tetrazoliumchlorid/5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
ORF.....	<i>open reading frame</i> – otevřený čtecí rámec
PCNA.....	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> - jaderný antigen proliferujících buněk
PFA.....	paraformaldehyd
PR.....	fotoreceptor
PTA.....	kyselina fosfowolframová
RNA ISH.....	RNA <i>in situ</i> hybridizace
SDS PAGE.....	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SEM.....	skenovací elektronová mikroskopie
<i>T.c.</i> .....	<i>Tripedalia cystophora</i>
TEM.....	transmisní elektronová mikroskopie
$\beta$ ME.....	2 – merkaptoethanol



## 4. Úvod

Mezi současnými živočichy nalézáme desítky typů očí lišících se morfologií i vývojem. Spektrum živočichů vybavených zrakovými orgány je nesmírně široké a vždy vzbuzovalo zájem, zda takový orgán jako je oko vznikl jedenkrát a zda se tedy z primitivní formy vyvinul v mnoho současných očních typů, nebo zda oči v různých okamžicích evoluce vznikly několikrát (nebo mnohokrát) nezávisle a třeba i ve formě odlišných prototypů. Mnoho i velmi základních otázek jako je tato, však stále nemá jednoznačné odpovědi. Původ očí a jaké mechanismy stojí za jejich různorodostí jsou tak stále aktuálně řešená témata.

Slibným přístupem se v současné postgenomické době jeví analýza širokého spektra modelových organismů s následným porovnáním jejich vizuálního aparátu, a to jak na úrovni morfologické, tak především molekulární (např. konzervovanost transkripčních faktorů a jiných klíčových komponent specificky se účastnících vývoje očí). Takto také byly v posledních letech učiněny fantastické objevy a popsány *pax* a jiné oči specifikuující geny již u žahavců (*Cnidaria*) KOZMIK *et al.* (2003), živočišných hub (*Porifera*) HOSHIYAMA *et al.* (1998) a *pax* dokonce i u vložkovců (*Placozoa*) HADRYŠ *et al.* (2005). Geny pro jednotlivé komponenty fototransdukční kaskády, donedávna lépe popsané jen u obratlovců a octomilky, jsou nyní charakterizovány u širokého spektra organismů, včetně několika žahavců SUGA *et al.* (2008), KOZMIK *et al.* (2008). K tomu samozřejmě přispělo i sekvenování žahavčích genomů (první dokončený genom žahavce *Nematostella vectensis* PUTNAM *et al.* (2007)).

*Tripedalia cystophora* (*T. c.*) neboli čtyřhranka trojitá, zástupce mořských žahavců třídy *Cubozoa* (čtyřhranky), je jedním z modelových organismů, které mají nedocenitelné přednosti pro studium očí, jejich variability a evoluční historie. Čtyřhranky, jako jediná třída žahavců, jsou aktivními lovci a mnoho z nich navíc obývá přibřežní porosty, kde je nezbytné vyhýbat se překážkám (vzhledem k fragilní konstituci žahavců), jako jsou kořeny stromů. Nejspíš právě proto tyto živočichové vyvinuli sofistikovaný vizuální komplex, orgán zvaný rhopalium. Rhopalium nese hned čtyři typy očí, přičemž mezi nimi nalézáme i komplexní oko s čočkou, retinou a rohovkou. Čočky těchto složitých očí dokonce obsahují gradient refrakčního indexu, který vylepšuje optické vlastnosti tohoto oka NILSSON *et al.* (2005).

Jednou z otázek řešených v této práci je, jak a z jakého materiálu se tyto čočky v ontogenezi žahavce vyvíjejí a jakým mechanismem je tvořen zmíněný gradient. Tato práce by měla osvětlit zda je možné i v případě tvorby gradientu refrakčního indexu hledat paralelu mezi žahavci a obratlovcem tak, jak je to možné pro celkovou morfologii tohoto oka a geny využívané při jeho výstavbě. Syntéza specifických krystalinů (proteinů čočky) je charakteristikou čočky každého organismu. Z čoček *Tripedalia cystophora* byly jako krystaliny popsány tři proteiny, které nebyly nikdy dostatečně analyzovány. Tato práce se zaměřuje právě na funkční popis jejich lokalizace v jednotlivých očních typech *T. c.* a zejména pak na jejich význam pro tvorbu gradientu refrakčního

indexu v čočkách velkých komplexních očí. Cílem této práce je i lépe popsat nový krystalin J2, především potvrdit, že má vlastnosti odpovídající krystalinům (hl. cytoplazmatickou lokalizaci), a že je tedy pravděpodobné, že takovou biologickou funkci skutečně zastává. Dále pak charakterizovat jeho produkci v průběhu vývoje očí, tedy v průběhu metamorfózy polypa v medúzu.

Extrémně zajímavá je přítomnost hned několika očních typů na jediném orgánu, který se navíc v rámci medúzy vyskytuje hned čtyřikrát (medúza využívá cekem 24 očí). Otázka původu a evoluce těchto jednotlivých očních typů je dalším předmětem studia této práce.

*Tripedalia cystophora* je tak zajímavým modelem i proto, že jsou to právě žahavci, kteří ve svých genomech podrželi mnoho z genů, které byly jinými liniemi živočichů ztraceny, ale jsou přitom přítomny v genomech obratlovců. Navíc jsou čtyřhranky mezi žahavci unikátní zmíněným způsobem života a z toho nejspíše vyplývající přítomností komplexních očí. Zarážející je, že mnoho z genů *T. c.* kódujících členy fototransdukční kaskády nebo se podílejících na regulaci vývoje očí je příbuzné obratlovcím variantám těchto komponent KOZMIK *et al.* (2008). Analýza transkripce některých z těchto genů je také předmětem této práce a má odhalit, zda jsou v genomu pouze přítomny a případně na nějaké minimální hladině exprimovány či zda se jedná o geny využívané a se smysluplným vzorem exprese.

Zdá se, že evoluce očí žahavců a obratlovců se ubírala podobným směrem a přitom tento směr byl nejspíš dosti odlišný od historie očí jiných bezobratlých.

## 5. Přehled literatury

Tato práce se zabývá studiem specifických proteinů a očí nového modelového organismu *Tripedalia cystophora*, medúzy s očima vybavenýma mimo jiné i čočkou. Proto v této části bude nejprve diskutována problematika týkající se očí, jejich vývoje a evoluční historie obecně a dále pak *Tripedalia cystophora* jako nový modelový organizmus pro studium evoluce očí.

### 5.1 Zrak jako základní smysl

Zrak je základní smysl, neboť detekce světla a tím daný určitý stupeň vizualizace okolního světa (závisející na dokonalosti oka a nervové soustavy) umožňuje živočichům výrazné zlepšení interakce s jejich prostředím. Alespoň základní typ očí se tak vyskytuje téměř ve všech živočišných kmenech (Obr. 1). Překvapující je ale právě variabilita očních typů.

Minimální uspořádání funkčního oka je dáno přítomností jedné fotoreceptorové buňky v blízkosti buňky vytvářející stínící pigment ARENDT a WITTBRODT (2001), jak je tomu například v Hesseho (očních) buňkách kopinatce. V jistých případech dokonce funkci obou buněk může plnit buňka jediná, jak bude rozvedeno pro *ocelli* larev *T. c.* Primitivní oči poskytují nositeli zpravidla informaci o intenzitě a směru světla v jeho okolí. Přídatné oční komponenty jako je čočka nebo rohovka mohou výrazně zvýšit citlivost oka a dramaticky zlepšit jeho optické vlastnosti.

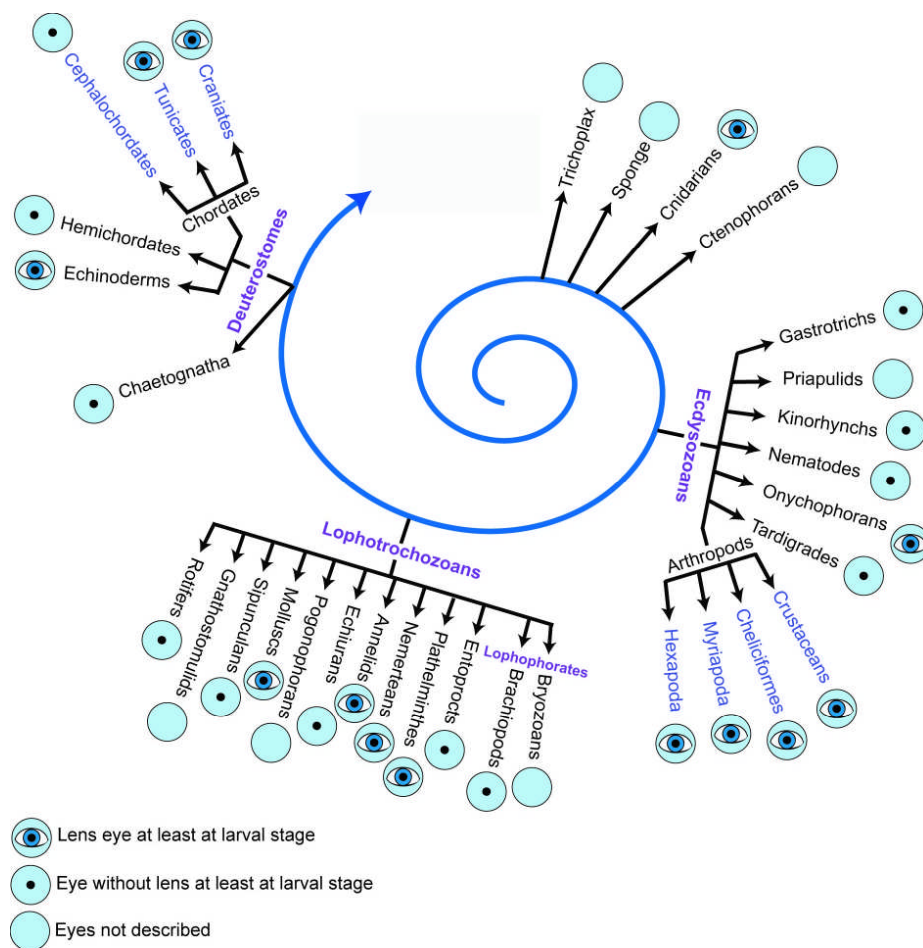
#### 5.1.1 Čočka a rohovka: zdokonalení oka

Jak je patrné z Obr. 1, mnoho z očí, která nalzáme napříč živočišnou říší je vybaveno čočkou. Čočka jako část oka zpravidla zvyšuje jeho světelnou citlivost a tím jeho nositele činí v prostředí lépe orientovaným. Jednoduše řečeno, „vidí toho víc“. Je tedy zcela zásadním vylepšením oka a její hlavní funkcí (v některých případech i rohovky) je soustředit větší množství světla do oka, případně jej ještě zaostřit tak, aby dopadalo přímo na vrstvu fotoreceptorů. Je tedy potřeba, aby rozptýlené světlo z okolí bylo „zalomeno“ do oka. Platí, že čím větší rozdíl hustot mezi prostředím (tedy například vodou či vzduchem a rohovkou; oční tekutinou a čočkou), tím větší je lom světla (tím více je tedy světlo přikloněno/odkloněno od pomyslné kolmice k povrchu) a tím více světla lze pro oko získat (pokud jde o přiklonění a tedy přechod z opticky řidšího do opticky hustšího prostředí).

Takto lze refrakci ovlivnit mnoha způsoby a co vše lze považovat za čočku je otázkou. Pro naše potřeby můžeme oči s čočkou jednoduše definovat jako oči obsahující přídatný refrakční (světlolomný) element situovaný před světločivnou vrstvou, zpravidla označovanou jako retina (sítnice) JONASOVA a KOZMIK (2008). S takovou definicí může být někdy obtížné odlišit rohovku a čočku, které v jistých případech dokonce splývají v jeden funkční celek (jako je tomu

třeba u octomilky). Předpokládejme ale, že většina očí je rohovkou, byť primitivní (např. pouze s ochrannou funkcí), vybaveno a čočka pro nás tedy bude komponenta nacházející se blíže fotoreceptorové vrstvě.

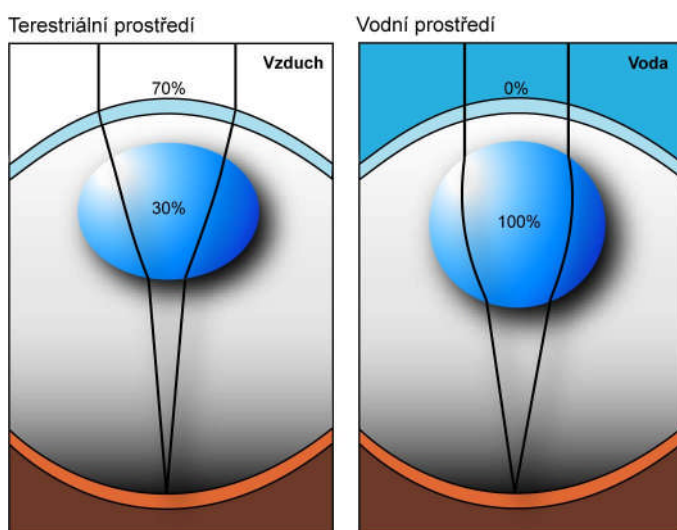
Byť u většiny čoček je materiálem zvyšující refrakční index hmoty čočky (a tedy schopnost lámat světlo) protein, byly popsány i jiné strategie. U mořských hvězdic (*Ophiocoma wendtii*) byly zdokumentovány opticky efektivní kalcitové čočky AIZENBERG et al. (2001). Podobně zajímavým případem jsou čočky mitochondriálního původu popsané mezi ploštěnci u *Entobdella soleae* SOPOTT-EHLERS et al. (2001).



**Obr. 1: Distribuce očí s čočkou v rámci živočišné říše.** Schéma představuje hlavní živočišné kmeny a shrnuje zda se u některého ze zástupců vyskytuje i oko vybavené čočkou nebo pouze jednodušší uspořádání či zda dokonce oči u kmene popsány nebyly. Symbol oka značí kmen, u kterého je u nějakého zástupce popsáno oko s čočkou. Symbol tečky pak takový kmen, kde byly popsány jen jednodušší oční typy, zpravidla primitivní pigmentové pohárky. Prázdné kolečko je u těch kmenů, u kterých oči vůbec popsány nebyly (především hlubokomořští aj. vodní živočichové). Připraveno pro JONASOVA a KOZMIK (2008).

### 5.1.2 Čočka a rohovka: determinace prostředí

Z hlediska lomu světla v očích je obrovský rozdíl mezi suchozemským a vodním prostředím. Vzhledem k tomu, že tkáně jako je rohovka mají vodě (především mořské) podobnou hustotu, je velmi zásadní rozdíl v utváření oka a vlastnostech čočky a rohovky mezi vodními a suchozemskými tvory. Například u člověka se světlo výrazně lomí na přechodu z opticky řídkého vzduchu do rohovky a následně ještě znovu (již výrazně méně), když přechází rozhraní oční tekutiny a čočky. Výsledná refrakce je dostačující k tomu, aby se do oka dostal dostatek světla. Srovnáme-li člověka v tomto ohledu například s kaprem, dojdeme k závěru, že u první refrakce (okolní prostředí a rohovka) téměř k žádnému lomu světla nedojde (viz Obr. 2). Tento chybějící rozdíl v optických hustotách prostředí a rohovky musí být kompenzován právě čočkou. Vodní organizmy tedy musí chybějící optickou sílu rohovky nahradit správnými vlastnostmi čočky. Těmi vlastnostmi jsou sférický tvar a vysoká optická denzita, obojí maximalizující její refrakční sílu a tedy lom světla směrem do oka LAND a NILSSON (2002).



**Obr. 2: Odlišné optické vlastnosti očí suchozemských a vodních živočichů.** Cesta světla v oku je znázorněna plnými černými čarami. U suchozemských organismů (levý panel) má větší optickou sílu rohovka (u člověka cca 70%), protože rozdíl mezi hustotou vzduchu a rohovky (a tomu odpovídající refrakce) je obrovský. Čočka má na refrakci menší (člověk cca 30%), ale stále velmi významný vliv a navíc je často místem, kde dochází k další úpravě vstupujícího světla (např. akomodace vlivem změn tvaru čočky). Situace je zcela odlišná u vodních organismů (pravý panel), kde rohovka, většinou o téměř stejné hustotě jako okolní prostředí (např. mořská voda) nemá téměř žádnou refrakční sílu. Veškerá refrakce se tak musí odehrát na přechodu voda (rohovka)/čočka. K tomu je čočka vodních živočichů zpravidla přizpůsobena vysokým refrakčním indexem (často v gradientu) a sférickým tvarem (popsáno zejména u ryb a hlavonožců). Retina oranžově, čočka modrý ovál, rohovka světle modře. Překresleno a upraveno dle PIATIGORSKY (2007).

Naneštěstí právě sférický tvar čočky je zdrojem mnohých optických chyb vyplývajících z odlišných vlastností různých částí čočky. Světelné paprsky se chovají odlišně, projdou-li koulí čočky v celé její šířce a narazí při tom na téměř kolmý povrch nebo pokud projdou čočkou při jejím okraji. Preferovanou úpravou čočky vodních organismů vedoucí k minimalizaci takto vznikajících

optických aberací (prvně popsáno u pstruha) se stala přítomnost gradientu indexu lomu (vlastně tedy gradientu optické hustoty) s maximem v centru čočky a poklesem směrem k její periferii JAGGER (1992). V čočce s gradientem refrakčního indexu se tak světlo postupně láme a nedochází k jednorázové refrakci. U ryb, olihní a několik dalších živočichů bylo popsáno, že tento gradient skrz čočku je tvořen rozdílnou koncentrací proteinů v různých částech čočky. U některých vodních organismů koncentrace proteinu na periferii čočky klesá až k hodnotám odpovídajícím indexu lomu 1,35 (1,34 má mořská voda), zatímco v centru čočky je téměř stoprocentní protein (index lomu 1,55) SWEENEY *et al.* (2007). To je obrovský rozdíl oproti suchozemským zvířatům, kde je zpravidla také odlišná koncentrace proteinů v různých částech čočky, ale nejbohatší střed dosahuje maxim kolem 40% (index lomu 1,4). Takové koncentrace proteinů přináší řadu dalších problémů, především s jejich agregací. Agregace proteinů a případné následné zakalení čočky výrazně zhoršuje její optickou kvalitu (způsobuje rozptyl světla) a v neposlední řadě i snižuje množství koncentrovaného světla. Proto jsou na proteiny čočky, krystaliny, kladeny velké nároky a to nejen z hlediska jejich životnosti (neboť mnoho čoček již v průběhu života neobnovuje svůj materiál), ale i z hlediska jejich vzájemných interakcí, tak, aby byly optimální pro minimalizaci jejich agregace SWEENEY *et al.* (2007).

## 5.2 Proteiny čočky: krystaliny a „gene sharing“ strategie

Jak bylo v předchozí části naznačeno, nejdůležitější komponentou čočky je její proteinová „výplň“ zajišťující refrakční sílu a průhlednost čočky zároveň. Proteiny, které plní tuto úlohu se obecně nazývají krystaliny a jsou neobyčejně zajímavou skupinou proteinů právě pro vlastnosti, které musí mít, aby splnili požadavky kladené na čočku. Těžko lze hovořit o ucelené skupině proteinů zastávajících tuto funkci, protože po porovnání složení čoček z různých organismů se ukázalo, že krystaliny jsou charakteristické právě svoji přítomností v čočce a refrakční funkcí, nikoli však jedinou specializací, která by je předurčila pro roli krystalinů. Většinu krystalinů nalézáme i mimo čočku a nejsou to tedy ani proteiny tkáňově specifické PIATIGORSKY (2007). Krystaliny lze nejlépe definovat jako v čočce hojné, cytoplazmatické a ve vodě rozpustné proteiny, zodpovědné za optické vlastnosti čoček, jak obratlovců, tak bezobratlých. Hojnost, tedy jejich značná produkce buňkami čočky, je nejdůležitější charakteristikou krystalinů, protože právě jejich dostatečná koncentrace zajišťuje vhodné optické vlastnosti čočky.

Popsané krystaliny jsou obvykle globulární, často oligomerizující proteiny, nezřídka příbuzné *heat shock* proteinům (nebo jiným proteinům s chaperonovými schopnostmi) nebo proteinům účastnících se oxidačně - redukčních pochodů. Jsou tedy rekrutovány z proteinů obecně odolávajících stresovým podmínkám. Studie mnohých krystalinů přinesly obecný koncept strategie tzv. sdílení genu („gene sharing strategy“) PIATIGORSKY (2003). Sdílením genu je myšleno vícero využití jednoho proteinu kódovaného jedním genem. Takový protein může mít dvě zcela

odlišné funkce, refrakční v čočce a katalytickou nebo např. chaperonovou jinde (ale např. i v čočce). Je to příklad strategie, kde protein získá novou funkci, bez ztráty funkce původní, jednoduše změnou exprese genu (např. vznikem nového vazebného místa pro transkripční faktory důležité pro vývoj čočky, jako je např. Pax6, v promotoru tohoto genu) a tedy bez předchozí duplikace. Duplikace genu kódujícího protein vhodných vlastností a exprese nové kopie v čočce, následovaná optimalizací vlastností tohoto genu/proteinu pro roli krystalinu je dalším způsobem vzniku krystalinů. „Gene sharing“ strategii na rozdíl od této lze považovat za evoluční strategii zvyšující využitelnost genomu bez jeho zvětšování.

Příkladem „gene sharing“ strategie mohou být  $\alpha$ -krystaliny obratlovců, proteiny z rodiny malých *heat shock* proteinů, i v čočce funkční chaperony, které chrání částečně denaturované krystaliny před agregací a pomáhají tak udržet průhlednost čočky HORWITZ (1992). Všechny čočky obratlovců obsahují kromě  $\alpha$ -krystalinů ještě  $\beta\gamma$ -krystaliny, které jsou příbuzné mikrobiálním stresovým proteinům. Nicméně i v rámci skupiny obratlovců se jednotlivé typy krystalinů liší a porovnáme-li krystaliny širšího spektra organizmů, zjistíme, že jsou téměř druhově specifické. Velmi variabilní jsou tzv. enzymové krystaliny, tedy krystaliny s primární enzymatickou funkcí CUTHBERTSON *et al.* (1992). Kupříkladu ptačí krystalin  $\varepsilon$  je laktátdehydrogenázou; chobotnice ve své čočce využívá štěpenou glutathion-S-transferázu (GST), přepisovanou ze stejného genu jako obvyčejná GST a hřebenatka má čočku i rohovku vyplněnou aldehyddehydrogenázou TOMAREV *et al.* (1994, TOMAREV *et al.* (1995, TOMAREV a PIATIGORSKY (1996).

### 5.3 Jeden fotopigment, mnoho krystalinů: oko jednou nebo vícekrát?

Otázka vzniku očí, především jestli tedy oko vzniklo jednou (monofyletický původ) či několikrát (polyfyletický původ), trápí již generace evolučních biologů. Zjevné anatomické a vývojové rozdíly jsou v kontrastu s konzervací hlavních regulátorů očního vývoje jako je *pax6*, který se podílí na vývoji očí, jak u octomilky, tak u myši QUIRING *et al.* (1994). Mnohé studie poukázaly na téměř univerzální využití *pax* genů pro vývoj očí živočichů. Na druhou stranu, nové práce ukazují, že *pax6*, dříve považovaný za tzv. *master control gene* očního vývoje GEHRING a IKEO (1999), je komplementován celou řadou jiných oči specififikujících genů (např. *six*, *eya*, *dach*) a že vývoj oka je primárně spouštěn ještě zcela odlišnými mechanizmy. Například nedávno publikovaný článek Mase a spolupracovníků přináší důkazy o zprostředkování indukce očního vývoje purinovou signalizací MASSE *et al.* (2007).

Navíc *pax6* tak, jak byl uvažován jako zmíněný hlavní a konzervovaný regulátor, je již poměrně odvozenou formou těchto transkripčních faktorů. Zástupce *pax* genů byl izolován i z *T. c.* Byť se i zde jedná zjevně o gen regulující oční vývoj, jeho struktura jako pravděpodobně jediného *pax* genu *T. c.*, předpokládejme tedy původnějšího typu, je kombinací *pax2* a *pax6* genů a obsahuje oktapeptid již ztracený v *pax6* genech KOZMIK *et al.* (2003).

Nicméně i kdyby konzervace *pax6* nebyla jako argument pro monofyletický původ dostačující, stále je zde v kontrastu s obrovskou morfologickou variabilitou konzervace fotopigmentů. Ve všech očích byly doposud nalezeny ve funkci fotoreceptoru varianty jediného proteinu, opsinu TERAOKITA (2005). Otázkou je, zda se jedná o konzervaci takovou, že první (a jediný) proto-oko již bylo vybaveno jistým pra-opsinem, který se dále vyvíjel v minimálně dvě hlavní, extrémně odlišné formy (lišící se i v kaskádě zpracovávající světelný signál) ARENDT (2003). Nebo zda byl opsin do různých očí vybrán pro své výjimečné vlastnosti, a to několikrát a nezávisle. Druhý scénář by podporoval i konzervaci výhradně určitého typu opsinů v některých vývojových liniích (pro oko jedné linie byl rekrutován typ odlišný od typu rekrutovaného jinou linií; to naznačuje i možné rozrušení opsinů ještě před objevením se očí). Z očí *T. c.* byl navíc izolován opsin ciliárního typu, tedy typu typického spíše pro obratlovce, což podněcuje k dalším diskuzím o evoluci opsinů. Podrobněji viz. KOZMIK *et al.* (2008).

Obrovská morfologická variabilita se zdá být v rozporu s monofyletickou teorií původu očí a je dobře možné, že jak *pax* geny, tak opsiny jsou příkladem konvergentní evoluce a v souladu s mnohonásobným nezávislým vznikem očí FERNALD (2006). To je dobře představitelný scénář, zvážíme-li fakt, že komorové oko může (dle teoretických modelů) vzniknout z ploché vrstvy fotosenzitivního epitelu během pouhých 400 tisíc generací NILSSON a PELGER (1994), a že tedy „na oči bylo v průběhu evoluce živočichů času dost“.

Jak bylo diskutováno, vznik čočky je významným milníkem v průběhu evoluce očí. Široké spektrum strategií, jak vytvořit čočku či rohovku s touto funkcí, bylo využito rozdílnými organizmy. Vezmeme-li to v úvahu společně s druhovou specifitou krystalinů, je zjevné, že čočky jsou polyfyletického původu. Je opravdu téměř nemožné najít cokoli jednotícího korneální čočku skákavek (pavouků) SU *et al.* (2007, WILLIAMS a MCINTYRE (1980) a sférickou čočku ryby JAGGER (1992).

Velmi podivné však je, že zmiňované *pax* geny jsou klíčovými pro expresi všech studovaných krystalinů čoček/rohovek a že tedy *pax* regulační elementy byly opakovaně využity jak pro konvergentní získání krystalinů čoček nebo rohovek, tak pro regulaci morfogeneze rozdílných typů očí KOZMIK *et al.* (2008).

## 5.4 Krystaliny *Tripedalia cystophora*

Jak bylo uvedeno v úvodu, *Tripedalia cystophora* je malá karibská medúza, člen třídy *Cubozoa* a tedy kmene žahavců, sesterské skupiny bilaterálně symetrických organismů. Je to zástupce první odvětvující se linie, která vyvinula zrakové orgány. V případě *T. c.* se dokonce jedná o poměrně komplexní oči různých typů, některé dokonce s rohovkou a čočkou.

Po homogenizaci čoček z velkého komplexního oka *T. c.* a separaci na SDS PAGE byly popsány tři krystaliny odpovídající třem hlavním pruhům: J1 (35 kDa), J2 (19,5 kDa) a J3 krystalin



(19 kDa) PIATIGORSKY *et al.* (1989). (Tento pokus byl opakován s mírně odlišnými výsledky v rámci této práce, viz kapitola Výsledky). Krystaliny *T.c.* byly sekvenovány jako peptidy a pro dva z nich byla nalezena homologie s již známými proteiny.

Pro J1 krystalin, který je nejhojnějším krystalinem čočky *T.c.*, byla nalezena homologie s ADP-ribozylglykohydrolázou, proteinem blízkým rodině selenoproteinů SelJ CASTELLANO *et al.* (2005). Prozatím byly izolovány tři různé cDNA kódující 35 kDa proteiny J1 krystalinu (J1A, J1B a J1C) identické v aminokyselinovém složení v 84 – 98%. Bylo prokázáno, že každý z těchto proteinů je kódován samostatným genem, který je tvořen jediným exonem (což by mohlo naznačovat jejich potenciální původ v bakteriálním genomu). Přestože jsou v kódující oblasti prakticky shodné, liší se částečně v oblasti promotorů.

V rámci zmíněné komparativní studie byla pro J1 nalezena největší homologie se selenoproteiny rodiny SelJ. Analýza také odhalila, že u *T. c.* je na místě selenocysteinu pouze cystein CASTELLANO *et al.* (2005). Pro objasnění potenciální role SelJ proteinů byly analyzovány promotorové oblasti několika SelJ a J1A, J1B a J1C ve snaze nalézt v těchto velmi vzdálených sekvencích vazebnou oblast, která by je také mohla determinovala pro expresi v čočce a tedy například funkci krystalinů. Vazebná místa pro některé *pax* geny (včetně *pax6*) byla nalezena ve všech studovaných sekvencích. Navíc studie lokalizace exprese SelJ u *Danio rerio* potvrdila lokalizaci v čočce během embryogeneze, a širší expresi ve starších jedincích (Castellano *et al.*, 2005).

SelJ podrodina selenoproteinů se vyskytuje pouze u paprskoploutvých ryb a jednoho druhu ježovky (přičemž všechny prozatím popsané selenoproteiny měly zástupce i mezi savci). Tato podivná distribuce v živočišné říši a homologie s bakteriálními ADP-ribozylačními enzymy pravděpodobně vypovídá o horizontálním transferu některého z bakteriálních selenoproteinů, který se udál několikrát u zmíněných živočichů. U *T. c.* pak mohl být tento gen vícekrát duplikován a využit jako hlavní krystalin. Otázkou však je přítomnost specifických vazebných míst v promotorech u různých SelJ a J1, které nejspíše musely vzniknout dodatečně nebo se nový gen poblíž takového místa objevil.

I po stanovení kompletní sekvence J2 krystalinu nebyla nalezena žádná homologie. V rámci této diplomové práce byl unikátní J2 krystalin lépe charakterizován, a byť stále nebyla nalezena žádná homologie s jinými proteiny, byla potvrzena role tohoto, do té doby téměř necharakterizovaného proteinu jako krystalinu. Podrobněji tedy kapitoly Výsledky a Diskuze.

J3 protein je jako krystalin diskutabilní. V původní práci z r. 1989 se mělo jednat o třetí pruh na proteinovém gelu z izolovaných čoček velkého komplexního oka o velikosti necelých 19 kDa. Již v práci z r. 2001, kde je J3 podrobněji analyzován se hovoří o J3 proteinu izolovaném z rhopalií PIATIGORSKY *et al.* (2001). Ani nám se protein této velikosti nepodařilo v čočce detekovat (viz Výsledky). Navíc minimální přítomnost J3 krystalinu v čočce podporuje i provedená RNA *in situ* hybridizace, která ukazuje na slabý signál na okraji čočky a naopak ukazuje extrémně silnou

expresi v oblasti gastrovaskulární dutiny rhopalia a na koncích chapadel; RNA byla detekována i v prouzcích vybíhajících za pigmentovou vrstvou RŮŽIČKOVÁ, osobní sdělení. Největší podobnost vykazuje J3 s proteinem prosaposinem, prekurzorem saposinu. Saposiny jsou rodina multifunkčních glykoproteinů, které propojují lysozomální enzymy s lipidy a aktivují jejich enzymatickou funkci. Především se tak účastní lysozomální degradace sfingolipidů. Vznikají ze zmiňovaného prekurzoru prosaposinu proteolytickým štěpením v pozdním endozómu VACCARO *et al.* (1999).

## 5.5 *Tripedalia cystophora* jako modelový organizmus pro studium evoluce očí

*Tripedalia cystophora*, česky čtyřhranka trojitá, byla poprvé jako nový druh popsána na Jamaice roku 1894 Sirem F. S. Conantem CONANT (1897). Rhopalia, pro čtyřhranky specifické vizuální orgány, byla však popsána pro příbuzné medúzy již před vydáním citovaného doplnění Haeckelova systému *Cubomedusea*. Dříve *T. c.* uchvacovala morfology a dnes se stala zajímavým objektem pro studium evoluce očí a to především pro svou vzdálenost a přesto v mnoha aspektech podobnost s obratlovci.

### 5.5.1 Taxonomie a životní cyklus

*Tripedalia cystophora* (*T.c.*) patří mezi *Cnidaria* (žahavce) třídy *Cubozoa* (čtyřhranky, kubomedúzy). Celou třídu lze charakterizovat jako neaktivnější skupinu žahavců, aktivně lovící kořist a k rychlému pohybu morfologicky přizpůsobenou. Nejdokonaleji ze všech žahavců mají vyvinuté senzorické orgány v komplexech zvaných rhopalia.

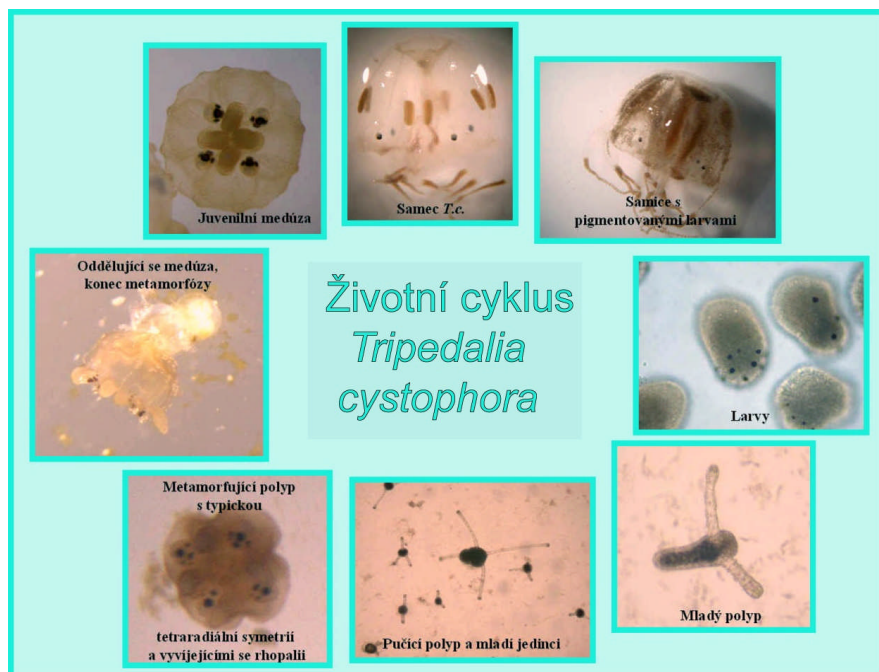
Systém žahavců v posledních několika letech doznal značných změn. Přibyla třída *Staurozoa* a v současnosti se tak žahavci dělí na třídy *Hydrozoa* (polypovci), *Cubozoa* (čtyřhranky), *Scyphozoa* (medúzovci), *Anthozoa* (korálnatci) a *Staurozoa* (kalichovky), dříve řazené k medúzovcům. Třída *Cubozoa* je považována v rámci žahavců za odvozenější skupinu a spolu s třídou *Scyphozoa* jsou pravděpodobně sesterskou skupinou *Hydrozoa* COLLINS *et al.* (2006).

*Cubozoa* jsou po většinu svého života medúzami, to je tedy dominantní životní stádium v rámci něž dochází k sexuálnímu rozmnožování. *Tripedalia cystophora* má životní cyklus v jehož průběhu dvakrát metamorfuje. Poprvé, když se mění z volně plovoucí larvy na přisedlého polypa a podruhé, když přechází z polypového stádia do stádia medúzy. *T. c.* je gonochorista se sexuální dimorfii. Samci jsou zpravidla menší než samice, gonády jsou uloženy v listách pomyslných hran lehce čtyřhranného zvonu. Samčí gonády jsou menší než samičí, které se plní opaleskujícími vajíčky vyplňujícími později značnou část těla samice. Morfologické rozdíly nalezneme i ve tvaru chapadel. Oplození je vnitřní a v rámci něj samec pravděpodobně předá samici spermie sbalené

v podobě jakéhosi spermatoforu. V průběhu oplodnění se žahavci přidrží chapadly, aby se od sebe nevzdálili, u čehož se předpokládá mimo jiné vizuální kontrola.

Spermiemi jsou následně oplodněna vajíčka ukrytá v samičích tělních dutinách. Z těch se vyvíjejí nejprve nepigmentované larvy, kterým se později na posteriorní části těla vyvíjejí *ocelli* (jedenobuněčné jednoduché oči) a které jsou schopné aktivního pohybu. Samice, která během vývoje larev nepřijímá potravu, umírá záhy po vypuštění larev manumbriem WERNER *et al.* (1971). Vypuštěné larvy přisedají k podkladu a metamorfují v polypové stádium, přičemž podklad (tedy dno s nižší intenzitou světla) je vyhledáno za základě negativní fototaxe. Jak bylo zmíněno, *T. c.* je unikátní přítomností komplexních očí s čočkou ve stádiu medúzy, naopak u larev byl popsán nejprimitivnější *ocellus* (jednoduché oko). To je složeno z jediné fotoreceptorové buňky s pigmentovým pohárkem, který je otevřen do prostředí a vyplněn mikrovilkami (*mikrovilli*). Ty vybíhají ze všech jeho stran a jsou sídlem vlastní fotorecepce. Uprostřed pigmentového pohárku pak vybíhá jediné *cilium* (bičík), fungující jako motor, který tlačí larvy dál od zdroje světla NORDSTROM *et al.* (2003).

*Ocelli* migrují z posteriorního konce dovnitř larvy a za den až dva z těla vypučí první dvě chapadla a následně další. Vyvíjí se polypové stádium, pro které je charakteristické vegetativní rozmnožování. Od mateřského polypa se při bázi těla, těsně nad peridermem (obal, vylučovaný ektodermem u nožního terče), oddělují a dorůstají noví polypi. Při dostatku potravy a správné teplotě se vegetativní polyp mění v polypa metamorfujícího, odlišitelného výraznou tetraadiální symetrií těla. Metamorfující polyp během několika dnů vyvine zřetelnou strukturu (složitý komplex očí) a zcela přestaví tělní plán. Nakonec se mění v juvenilní medúzu. Metamorfóza je kompletní (jeden polyp, jedna medúza a žádný zbytek tkání schopných regenerace) a obdobná metamorfóze popsané u jiné čtyřhranky *Carybdea marsupialis* STRAEHLER-POHL a JARMS (2005).



**Obr. 3: Životní cyklus *Tripedalia cystophora*.** V průběhu svého života prochází čtyřhranka stadiem larvy (planuly), polypa a medúzy. Medúza je stádium dominantní a konečné. Fotografie v jednotlivých rámcích, zleva doprava a po směru hodinových ručiček, zachycují různá vývojová stádia (popis viz rámeček) tak, jak v rámci životního cyklu následují.

### 5.5.2 Morfologie vizuálních orgánů: rhopalium

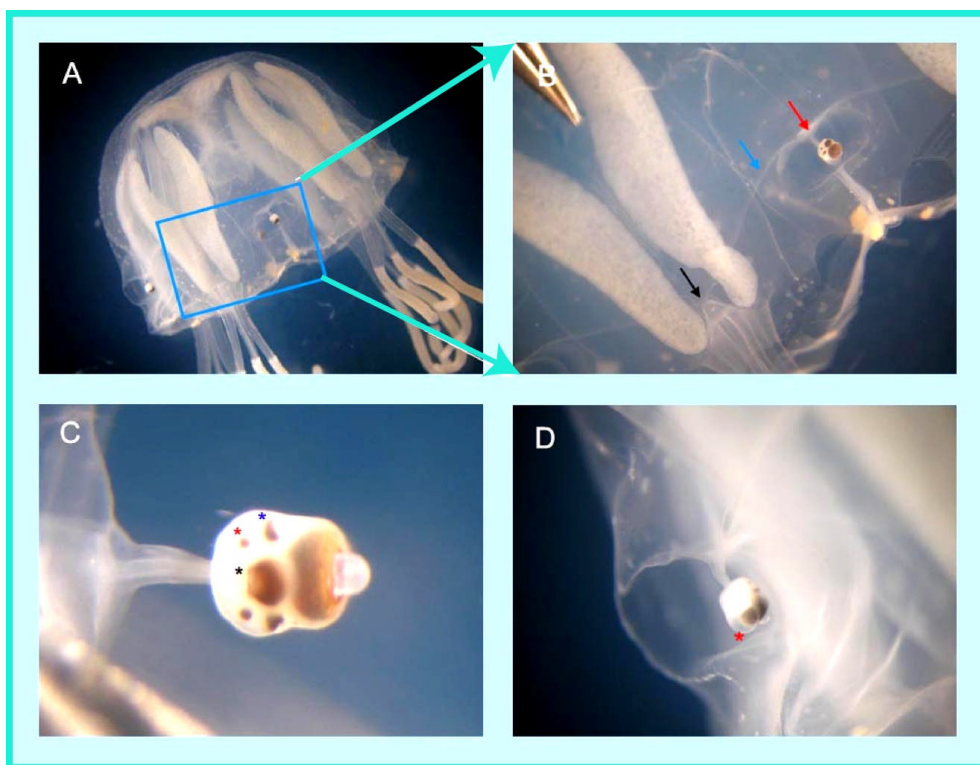
V každé ze čtyř stěn zvonu popisované medúzy se nachází jedno rhopalium, komplex sensorických orgánů zavěšený v sensorické dutině. Rhopalia jsou oblého tvaru, asi 500  $\mu\text{m}$  dlouhá a se zvonem spojena stopkou, kterou prochází vedení, jak nervové, tak gastrovaskulární soustavy. Každé rhopalium nese šest očí čtyř různých typů. Nejvýraznějšími a nejvyvinutějšími jsou komplexní oči s čočkou, malé a velké. Dále se zde nachází dva typy jednodušších očí: jamkovité oko (dále označované jako pit) a žlábkovité oko (slit). Každé z těchto očí je na rhopaliu přítomno dvakrát, symetricky po obou stranách pomyslné osy spojující velké a malé komplexní oko s čočkou. Uvážíme-li, že každý jedinec nese čtyři rhopalia, potom má tedy celkem dvacet čtyři orgánů schopných fotorecepce (očí).

Součástí rhopalia je i statocysta se statolitem, která se nachází na dolní straně rhopalia. Tato struktura má nejspíše za úkol udržet rhopalium ve správné pozici PARKEFELT *et al.* (2005); spekuluje se i o případné funkci coby statokinetického ústrojí. Složení bylo analyzováno v rámci této diplomové práce a popis je součástí výsledků a diskuze.

Rhopalia jsou zavěšena na kmeni vycházejícím ze zvonu medúzy, kterým jsou vedeny živiny do gastrovaskulární dutiny rhopalia (vprostřed rhopalia) a kterým je vedeno nervové spojení

s nervovým provazcem kolem dolního okraje zvonu. Zavěšena jsou v pozici, kdy je malé horní oko s čočkou orientováno proti zvonu a velké oko s čočkou shlíží dolu, lehce pod medúzu.

*Tripedalia cystophora* žije v mangrovech, pobřežních porostech teplých karibských vod, kde vyhledává shluky drobných korýšů, kteří se shromažďují v kuželech světla dopadajícího skrz listy mangovníků a prosvětlujícího tak jinak poměrně tmavé vody mangrovů. Klíčovou je pro ni tudíž schopnost nalézt tyto světelné kužely, k čemuž ji bezesporu slouží zrakové orgány rhopalia. *Tripedalia* se tedy vyznačuje pozitivní fototaxí, která ji k těmto místům navede a kde se jí posléze na chapadla nachytají drobní korýši. Navíc prostředí, ve kterém se pohybuje je dosti členité (kořeny mangovníků apod.) a tělo medúzy velmi křehké. Pro přežití medúzy je tedy nezbytné se těmto překážkám vyhnout, k čemuž pravděpodobně zrakové orgány rhopalia slouží také COATES (2003). Předpokládá se, že sofistikovaný senzoričtý systém *T. c.* je schopen i pokročilejších vizuálních vjemů (tvorby obrazu a jeho částečného zaostření), což ukazují studie optického zázemí NILSSON *et al.* (2005) i nervového systému rhopalia GARM *et al.* (2006, PARKEFELT *et al.* (2005, SKOGH *et al.* (2006).



**Obr. 4: Pozice a vzhled rhopalia.** Rhopalium je zavěšeno na zvonu medúzy ve čtyřech senzoričtých dutinách (A). Modrý výřez je v detailu zobrazen na druhé fotografii (B), kde je dobře patrná senzoričtá dutina a v ní zavěšené rhopalium (červená šipka). Dále vidíme nervový kruh obkružující celý zvon medúzy a vstupující do rhopalií (modrá šipka) a jedno z pedaliových ganglií (černá šipka). Rhopalium je v dutině zavěšeno na stopce, kterou prochází nervy a kanál vstupující do gastrovaskulární dutiny v centru rhopalia. Na snímku vidíme zcela vpravo velké oko s čočkou, malé oko s čočkou (černá hvězdička), pit (červená hvězdička) a slit (modrá hvězdička). Při pohledu zdola (D) je patrná pod velkým komplexním okem s čočkou statocysta (červená hvězdička).

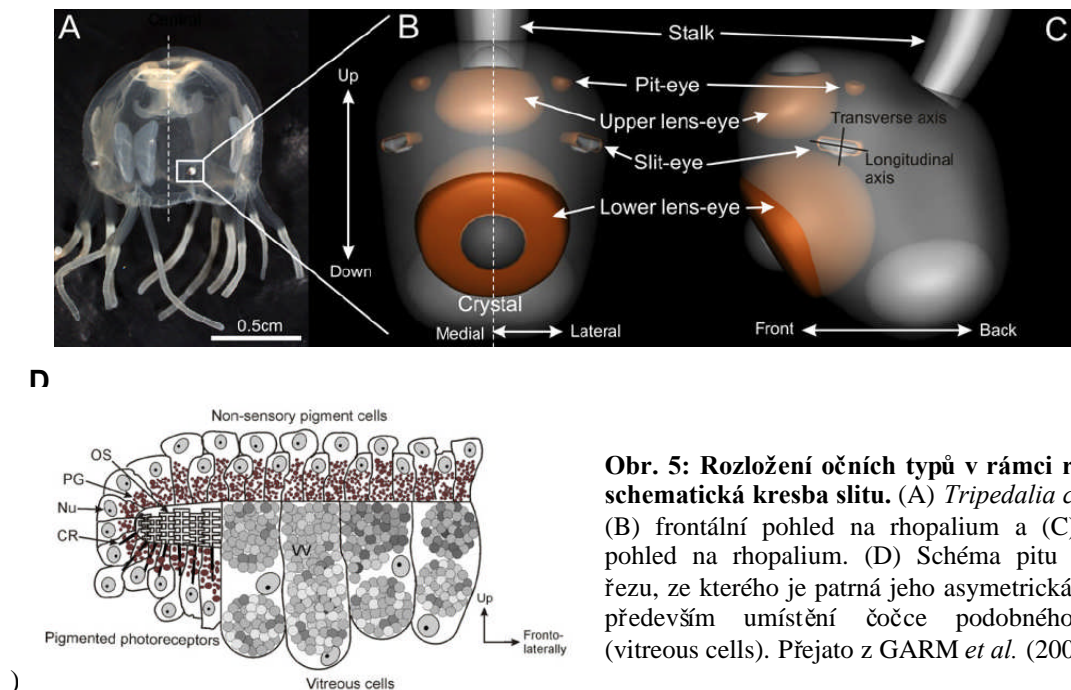
### 5.5.2.1 Pit a slit

Jedním z cílů této diplomové práce bylo lépe charakterizovat pit a slit *T. c.* a to především za účelem srovnání s velkými komplexními oky a ve snaze lépe pochopit historii těchto unikátních očí. Byla studována přítomnost jednotlivých krystalinů, analyzována detailní struktura těchto očí na TEM i SEM i připravena histologie těchto očí.

Nedlouho před dokončením této práce byl publikován morfologicky a opticky zaměřený článek, detailně popisující pit a slit GARM *et al.* (2008). V článku je precizně popsána morfologie těchto očí a je diskutována případná specializace každého z očních typů, proto většina TEM a SEM dat týkající se těchto typů očí byla z výsledků této práce vypuštěna.

Tak jak je patrné ze schématu (Obr. 5), pity (jamkovité oči) jsou umístěny po straně horního (menšího) oka s čočkou a otvírají se mírně vzhůru a do strany. Slity (žlábkovité oči) se nacházejí po straně mezi horním a dolním okem s čočkou; jejich otevření je směřováno více laterálně a částečně nahoru.

**Slit** je komplexnější než pit a je tvořen čtyřmi buněčnými typy: přibližně 200 pigmentovanými fotoreceptory (PPR), 30 – 40 nepigmentovanými fotoreceptory, asi 40 buňkami čočky a nesenzorickými pigmentovými buňkami. Hlavním buněčným typem je PPR s relativně krátkým vnějším fotoreceptivním segmentem. Rozmístění jednotlivých buněčných typů je specifické pro dané části oka a tak např. nepigmentované fotoreceptory se nacházejí víceméně pouze podél horní strany slitu. V otevření slitu se pak nachází shluk asi čtyřiceti buněk čočky. Cytoplazma těchto buněk je zcela vyplněna váčky s hmotou o vysoké elektronové hustotě.



**Obr. 5: Rozložení očních typů v rámci rhopalia a schematická kresba slitu. (A) *Tripedalia cystophora* (B) frontální pohled na rhopalium a (C) laterální pohled na rhopalium. (D) Schéma pitu v příčném řezu, ze kterého je patrná jeho asymetrická struktura, především umístění čočky podobného objektu (vitreous cells). Přejato z GARM *et al.* (2008)**

Optické studie obou očí potvrdily, že nejsou schopné formování obrazu a také, že čočka slitu nemá pro oko prakticky žádný optický význam, že tedy není schopná koncentrace světla na retinu (fotoreceptory). Autoři spekulují o případné funkci ve filtraci vlnových délek, což by mohlo být výhodné, protože opsiny vedle hlavního absorpčního maxima mají i druhé, méně výrazné, a to v oblasti UV. Odstranění této části světelného spektra by tak mohlo mít funkční význam. Malé oči pit a slit jsou tedy nejspíš jen světelnými senzory, schopnými podat informaci o směru a intenzitě světla a její případné změně, např. náhlém poklesu (kupříkladu když kořen mangovníku světlo zacloní a je třeba se mu vyhnout). Analýza zorného pole slitu také poukázala na jeho uzpůsobení pro detekci pohybů ve vertikální ose.

**Pit** je malý sférický oční pohárek, přibližně třikrát menší než slit (pit dosahuje 25 – 30  $\mu\text{m}$  v průměru). Je tvořen jediným buněčným typem, pigmentovanými fotoreceptory a v jeho otevření není ani náznak struktury připomínající čočku. Přibližně 300 fotoreceptorových buněk tak tvoří jamkovité oko se zorným úhlem 60° GARM *et al.* (2008).

Tyto dvě jednoduché oči mají mnoho společného. U fotoreceptorů ani jednoho z nich nebyly nalezeny axony. Fotoreceptory jsou vždy poměrně malé a seskupené blízko sebe, dáváje tak tušit, že signál je přenášen a pravděpodobně posilován i mezi jimi samotnými a dále pak k nervům v dalších buněčných vrstvách a to kontaktem buněčných těl. Posilování signálu jeho integrací z více receptorů nasvědčuje i jejich extrémně krátký vnější segment, který tyto fotoreceptory činí velmi málo citlivými.

### 5.5.2.2 Komplexní oči s čočkou

V rámci každého rhopalia se nacházejí dvě komplexní oči s čočkou, menší a větší, která jsou umístěna pod sebou nad statocystou (Obr. 5). Větší oko je o průměru asi 250  $\mu\text{m}$ , menší 150  $\mu\text{m}$ . Jsou podobné spíše očím vývojově pokročilejších organismů, které neregistrují jen intenzitu světla a jeho směr, ale přinášejí i další vizuální informace. Oči a jejich nervový systém jsou uspořádány v rhopaliu zjevně bilaterálně symetricky SKOGH *et al.* (2006) a to tak, že midsagitální rovina prochází středem horního malého i dolního velkého oka s čočkou a pit a slit jsou umístěny po stranách těchto očí, vždy po jednom na každé straně, tak jak bylo popsáno výše (viz. Obr.5).

Oči s čočkou mají široké zorné úhly a průhlednost zvonu pravděpodobně umožňuje i pozorování přes něj (týká se velkého oka s čočkou). *T.c.* má tedy k dispozici téměř 360° pohled na své prostředí.

Kromě buněčné vrstevnaté čočky jsou komplexní oči *T. c.* vybaveny i retinou se složitější stavbou než jakou nacházíme u pitu či slitu a obě oči kryje jednobuněčná vrstva rohovky bez optické síly. Čočky jsou vybaveny gradientem refrakčního indexu (rozložení je odlišné mezi velkým a malým okem), který umožňuje přesnější cílení světelných paprsků na retinu (i když obraz není přímo zaostřen na retinu, ale mírně či více za ní; NILSSON *et al.* (2005)). Úzký prostor mezi



čočkou a retinou je vyplněn amorfni buněčnou hmotou. Retina je tvořena hlavním buněčným typem, pigmentovaným fotoreceptorem. Lze ji tak rozdělit na apikální část, kde se nacházejí vnější segmenty těchto receptorů, část pigmentovou, vrstvu jader a vrstvy odstupujících axonů. Všechny tyto části jsou součástí jediné fotoreceptorové buňky. Nejcitlivější jsou fotoreceptory *T.c.* k světlu o vlnové délce odpovídající modré barvě, což je běžné u vodních organismů, neboť modré světlo prostupuje ve srovnání s ostatním viditelným zářením vodou nejlépe. U velkého oka s čočkou byl kromě tohoto maxima pohybujícího se kolem 500 nm empiricky změřena i senzitivita v úzkém rozmezí UV GARM *et al.* (2007). Výsledky studie, kde byl izolován, *in vitro* exprimován a absorpčně charakterizován ciliární opsin z *T. c.* jsou v zásadě ve shodě s těmito výsledky KOZMIK *et al.* (2008). Mimo tento hlavní buněčný typ se v retině vyskytují ještě pravděpodobně typy další, méně významné jako např. čistě pigmentové buňky.

V přední části velkého oka vybíhá pás nejspíše pouze pigmentových buněk, překrývá fotoreceptory a tvoří clonu okolo čočky, která je schopná zmenšit průměr otvoru, kterým vstupuje světlo z 150 $\mu$ m na 100 $\mu$ m během zhruba minuty NILSSON *et al.* (2005). Přítomnost clony není jediným rozdílem mezi malým a velkým komplexním okem a u žahavců je takové nadstavba opravdu unikátní. Odlišné je i uspořádání fotoreceptorů v retině a vlastnosti čoček.

Čočky velkého a malého oka se liší svými optickými vlastnostmi. Čočka malého oka má homogenní centrum a gradient refrakčního indexu se vyskytuje jen ve vnější polovině čočky. Velké oko s čočkou má refrakční gradient probíhající kontinuálně celou čočkou a tak i opticky lepší vlastnosti. Světelné paprsky se v jeho případě sbíhají blízko za retinou, kdežto u menšího oka se paprsky potkávají poměrně daleko za retinou a navíc se objevují sférické poruchy. V ani jednom případě tedy není obraz zcela zaostřen na retině. Výsledně je díky ne zcela dokonalým čočkám a neoptimalizovanému tvaru fotoreceptorového pole obraz rozostřen a intenzita dopadajícího světla je u různých skupin fotoreceptorů dramaticky odlišná. Teorii specializace každého ze čtyř typů očí přítomných v rhopaliu pak, na základě těchto a dalších informací, nabízí Nilsson a kolegové.

### 5.5.3 Nervová soustava rhopalia

I kdyby oko bylo schopné na retině tvořit sebedokonalejší obraz, bez zpracování CNS by byl nevyužitelný. Většina žahavců je vybavena jen primitivní nervovou soustavou, která by rozhodně zpracování a využití obrazu nebyla schopná. U *T. c.* bylo pozorováno chování evidentně řízené zrakem (např. uhýbání předkládaným překážkám GARM *et al.* (2007)) a popsána velmi komplexní nervová soustava v rhopaliu. Je tak tedy dobře možné, že *T. c.* je skutečně schopná neobvyklou vyspělost svých zrakových orgánů, alespoň částečně, využít.

U medúz je nervová soustava obvykle tvořena hlavním nervovým provazcem (nervovým kruhem) při bázi zvonu a jemnou nervovou sítí. Tuto základní strukturu nalézáme i *T. c.*, u které pak dále nacházíme ganglia nad pedaliemi (horní část chapadel) a složitá nervová soustava



prostupuje i celým rhopaliem. Nervstvo rhopalií nebylo téměř popsáno až do roku 2005, kdy byla zveřejněna práce Parkefeltové a kolegů PARKEFELT *et al.* (2005). Tato skupina popisuje PCNA - imunoreaktivní neurální síť, síť nervových jader v blízkosti jednotlivých očí a jejich spojů: komisur a konektiv. Jedná se o popis pouze dílčí, neboť tato metoda zobrazuje jen ty nervy, prezentující v denaturačním prostředí epitop podobný čtrnácti aminokyselinovému epitopu PCNA (proliferating cell nuclear antigen) použitému při přípravě dané protilátky proti PCNA. I tato část nervového systému však dostatečně demonstruje jeho nečekanou složitost.

PCNA – imunoreaktivní (PCNA – ir) neurony se nacházejí v horní polovině rhopalia a vytváří šest párů bilaterálně symetrických nervových jader spojených třemi komisurami (propojují symetrické strany). Vertikálně jednotlivá jádra jsou spojována nejméně čtyřmi konektivami na každé straně. Další PCNA – ir nervová vlákna a neurophil se nachází okolo kmene a mezi stropem gastrovaskulární dutiny (GD) a ektodermem, dále po stranách GD poblíž pitů. Tenčí vlákna a difúznější PCNA – ir síť je přítomna po obvodu celé GD a velkého oka s čočkou PARKEFELT *et al.* (2005). Toto barvení neodhaluje propojení s nervovým provazcem při bázi zvonu. Nicméně jej doplňuje práce Garmse a kolegů, kteří na morfologické úrovni charakterizovali nervstvo stopky rhopalia (včetně jednotlivých synapsí), propojující rhopaliem s tzv. rhopaliovým gangliem GARM *et al.* (2006). Navíc popisují i další nový nerv ve stopce kmeni s proprioreceptivní funkcí (mechanoreceptorová funkce). Propojení provazce s rhopaliem ukazuje ve své práci i V. J. Martin jako barvení RFamid-positivních neuronů procházejících kmenem (neuvádí však dostatečné podrobnosti k barvení) MARTIN (2002). Dále popisuje u druhu *Carybdea alata* (též *Cubozoa*) protahování bazální části fotoreceptorů do axonů vybíhajících do nervových svazků bezprostředně za retinou, které nejspíše dále spoluvytváří nervová jádra popisovaná Parkefeltovou. Nervová vlákna vybíhající z jader následně vstupující jako RFamid - pozitivní svazky do kmene zajišťující spojení s hlavním nervovým provazcem u báze zvonu. Tato integrace pak zajišťuje možnou odpověď organismu na vizuální vjem, umožňuje ovládní motoriky svalových skupin zvonu a tím i pohybů zvířete.

Pohyb medúzy je řízen pomocí *pacemakerů* nalézajících se právě v rhopaliích a nervové impulsy mezi nimi pravděpodobně řídí a převádí nervový provazec při bázi zvonu SATTERLIE a NOLEN (2001). Ve své poslední práci již Garm směle označuje rhopalia za “mozek“ medúzy GARM *et al.* (2006).

## 5.6 Genomy žahavců: nečekaná pokročilost a/nebo zachování jinde ztraceného?

To, že komplexita životní formy daného organismu zdaleka nesouvisí s velikostí genomu, je obecně známo a označováno jako *c-value* paradox, nověji např. GREGORY (2005). Pokud se tedy smíříme s myšlenkou, že primitivní žahavci (jakými po morfologické stránce jednoznačně oproti např. obratlovcům žahavci jsou) mohou mít genom velikosti více než poloviny myšního (jak to mu také je, [www.genomesize.com](http://www.genomesize.com)), můžeme však dále mylně předpokládat, že tento genom bude vybaven sadou genů typických především pro „starobylé“ žahavce. Stává se však čím dál tím zřejmější, že živočišné druhy na všech úrovních sdílí překvapivé množství genů a že tyto geny v evoluci byly pouze odlišně využity a to často velmi podobně, neboť příroda samozřejmě musela přihlídnout k čemu se vlastně „hodí“. Určitý gen nebo spíše skupina genů se v některé z vývojových větví v průběhu evoluce ztratily KORTSCHAK *et al.* (2003), celkově ale organismy sdílí překvapivé množství genů.

Žahavci patří k bazální skupině organismů, přesto se zdá, že toho s námi mají společného více než tradiční a tzv. pokročilejší modelové organismy octomilka či háďátka. Genová konzervace od žahavců k obratlovcům je zjevná, ukazují to případy mnoha studovaných genů typických pro procesy popsané především z vyspělejších organismů, jako je specifikace mezodermu. Například mezoderm specifikující faktor *twist* byl popsán i u žahavců a v klíčové helix-loop-helix oblasti je podobnější obratlovcům než tentýž gen octomilky (*Drosophila*) či háďátka (*Nematoda*) SPRING *et al.* (2000). Navíc si žahavci udrželi i některé geny, které byly následně v pokročilejších organismech ztraceny GALLIOT a SCHMID (2002).

Publikována práce Kortschaka a kolegů založená na rozsáhlém EST projektu žahavce, korálu *Acropora millepora* (*A.m.*) podporuje veškerá tvrzení o konzervaci genových sad žahavců a obratlovců KORTSCHAK *et al.* (2003). V rámci tohoto projektu porovnali jednotlivé EST *Acropora*, ve snaze lépe porozumět evoluci genomů mnohobuněčných organismů, s dostupnými genomy, tedy především lidským, myším, genomem octomilky (*Drosophila melanogaster*) a háďátka (*Caenorhabditis elegans*). Zjistili, že mnoho z genů, o kterých se předpokládalo, že jsou obratlovcími novinkami, je zastoupeno právě v genomu *A.m.* Více než 10% EST *A.c.* s odpovídajícími sekvencemi mezi mnohobuněčnými mělo velmi podobné lidské homology a zároveň nebylo přítomno v genomech octomilky ani háďátka. Tato kategorie genů obsahovala jak transkripční faktory, tak proteiny metabolismu považované za obratlovcí evoluční novinky. V liniích vedoucím k modelovým organismům octomilce a háďátka tedy muselo dojít k mnohem větší ztrátě genů než se obecně předpokládalo. Navíc sekvence *A.m.*, které měly své zástupce v obratlovcích, octomilčím i háďátčím genomu vykazovaly větší podobnost právě k obratlovcím sekvencím KORTSCHAK *et al.* (2003). Stejně výsledky jsou k dispozici i po porovnání genů *Nematostella vectensis*, kde jedna studie dokonce ukazuje i konzervaci pozice intronů na příkladu

genu pro lamin B1 a jeho porovnání s lidským. Zde je uspořádání zachováno mezi zmíněnou sasankou a námi, ale naprosto nepodobné organizaci laminu B1 z octomilky či háďátka ZIMEK a WEBER (2008). I z tohoto hlediska se *Tripedalia cystophora*, zástupce žahavců navíc vybavený „nadstandardním“ vizuálním a nervovým systémem, jeví jako zajímavý modelový organizmus.

## 6. Materiál a metody

Následuje přehled použitého materiálu a metod.

### 6.1 Materiál

Přehled klíčových chemikálií a jiného materiálu s uvedením výrobců. Řazeno abecedně.

Advantage polymeráza (Clontech)

Alexa Fluor 594 nebo 488, *highly cross-adsorbed* 2mg/ml, goat anti myš či anti králík (Invitrogen)

Alkalická fosfatáza – calf intestine (New England BioLabs)

Anti-digoxigenin-AP Fab fragmenty (Roche)

Amidočern 10B (Lachema)

DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) (Roche)

DIG RNA Labeling Mix 10x (Roche)

DNáza bez RNáz (Roche)

DyNAzyme polymeráza (Finnzymes)

FUGENE 6 Transfection Reagent (Invitrogen)

Glutaraldehyd (25% v PBS) (Sigma)

Jasná zelená (Light green yellowish) (International Enzymes Limited)

Kyselina fosfowolframová (Lach-Ner)

Kyselina maleinová (Sigma)

Levamisol (Sigma)

N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin (TEMED) (Fluka)

NBT/BCIP roztok (Roche)

NiNTA agaróza (Qiagen)

Oranž G (Fluka)

Paraformaldehyd (Sigma)

Poly-L-lysinovaná podložní skla SuperFrost Plus (Menzel – Gläser)

Ponceau S roztok 10x (Fluka)

RNA later (Ambion)

RNasin HRP (Takara)

Rnáza A (Epicenter)

Paraformaldehyd (Sigma)

Proteináza K (Roche)

Protílátka koza anti králík konjugovaná s HRP (DacoCytomation)

Simply Blue SafeStain (Invitrogen)  
Syntetická mořská sůl (Instant Ocean)  
Taq polymeráza (New England BioLabs)  
Tissue freezing medium (medium pro mrazové zalévání tkání) (Jung)  
Tween 20 (Fluka)  
T3, T7 RNA polymeráza (Roche)  
T4 DNA ligáza (New England BioLabs)  
Transkripční pufr 10x (Roche)  
Vajíčka *Artemis salina* (Brine shrimp eggs) – Star Artemis (Inter Ryba)

## 6.2 Základní roztoky a média

Pro většinu experimentů byly nezbytné tyto roztoky:

ASW (umělá mořská voda): 3,8% mořská sůl Instant ocean při 27°C (tj. hustota 1,022g/cm<sup>3</sup>), rozpuštěno v dH<sub>2</sub>O o pH 5,5 – 6, filtrováno přes 0,22 μm filtr. Výsledné pH 8,1 – 8,3.

EB pufr: 10 mM Tris-Cl, pH 8,5. Sterilizováno.

LB agar: 1% Bacto Trypton (Difco), 0,5% kvasničný extrakt (autolyzát) (Difco), 0,5% NaCl, 2% agar-agar. Před přidáním agaru upravit pH na 7,3. Sterilizovat.

LB médium: 1% Bacto Trypton (Difco), 0,5% kvasničný extrakt (autolyzát) (Difco), 0,5% NaCl, sterilizováno.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, sterilizováno

PBT: 0,1% Tween 20 v PBS

4% PFA v PBS: 4% paraformaldehyd rozpuštěný v PBS při 60°C a po přidání několika kapek 10M NaOH

## 6.3 Metody

Následuje obecný popis metod s případnými modifikacemi pro práci s *Tripedalia cystophora*.

### 6.3.1 Založení kultur, sběr vzorků a kultivace *Tripedalia cystophora*

Materiál: ASW (umělá mořská voda); RNA later; 4% PFA v PBS; skleněné Petriho misky; plast pro práci s tkáňovými kulturami (Nunc); hustoměr; pH metr; pinzety

Přístrojové vybavení: stereolupa

Postup: Dospělci obou pohlaví byly naloveni v portorických mangrovech. Vypreparovaná rhopalia a případně celé medúzy byly fixovány v 4% paraformaldehydu (PFA) v PBS 1 hodinu, 3 hodiny anebo v něm přímo uloženy v 4°C. Někteří jedinci byly uloženi do RNA later pro konzervaci RNA a na imunoblot (western blot) analýzy. Desítky jedinců byly dovezeny *in vivo* a larvy uvolněné do kultivačních lahví z oplodněných samic (plast pro práci s tkáňovými kulturami) se staly základem pro stabilní kulturu polypů. Kultury polypů jsou drženy při teplotě 27°C a krmeny čtyřikrát až pětkrát týdně naupliemi *Artemis salina*. Voda je měněna po každém krmení (umělá mořská voda 38g soli/l dH<sub>2</sub>O). Při krmení s touto frekvencí lze běžně pozorovat a sbírat spontánně metamorfuující polypy (přeměna v medúzu). Metamorfózu lze indukovat i zvýšením teploty a frekvence krmení. Kultivujeme-li polypy několik týdnů při 23°C a krmíme jednou týdně, je třeba zvýšit teplotu na 28°C a krmit pětkrát týdně.

### 6.3.2 Příprava krmiva – kultivace nauplií

Materiál: vajíčka *Artemis salina* (Brine shrimp eggs) – Star Artemis; ASW (35g/l)

Přístrojové vybavení: malé vzduchové čerpadlo (UniStar 2,5W)

Postup: Přidáme 1,5 – 2g vajíček do 1l ASW. Kultivujeme nejméně 22 hodin při 27 - 30°C, pH 8,1 - 8,4, intenzivním osvětlení a kontinuálním provzdušňování v kónické nádobě. Po této době odpojíme od aerace a necháme stát 10 minut. Za tuto dobu prázdné vaječné obaly vystoupají k hladině a ještě plná vajíčka klesnou ke dnu. Vyvinuté nauplie se pohybují ve spodní třetině nádoby odkud je bez příměsi vaječných obalů či plných vajíček odsajeme. Tyto narůžovělé larvy přikapeme do kultivačních nádob s polypi (odebíráme je během deseti minut od zastavení provzdušňování).

### 6.3.3 Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii

Materiál: pryskyřice PolyBed 812

Roztoky: Karnovského fixativum: 2,5% glutaraldehyd a 2,5% PFA v 0,1M kakodyl-HCl ve vodném roztoku; PBS; 4% PFA v PBS; 2% vodný roztok OsO<sub>4</sub>, 2,5% vodný roztok acetátu olova; methylová zeleň

Přístrojové vybavení: transmisní elektronový mikroskop Joel – 1011 a příslušenství, mikrotom Ultracut 1000

Software: MEGAvue III Soft

Postup: Rhopalia juvenilních medúz (dostupný čerstvý materiál) vypreparujeme z těla medúz a fixujeme 24 hodin v Karnovského fixativu při 4°C. Po této době vzorky oplachujeme 12 hod při

4°C roztokem 0,1% kakodylátového pufru. Některá rhopalia (dospělých medúz) fixujeme též v 4% PFA v PBS a po nejméně 24 hod fixaci převedeme do PBS. Všechny vzorky dále post-fixujeme 2 hod 2% OsO<sub>4</sub> při 4°C a následně opláchneme dH<sub>2</sub>O. Následuje dehydratace vzorků vzestupnou řadou EtOH s převedením do acetonu a finálním zalitím do pryskyřice Poly/Bed 812. Post-fixace i zalití do pryskyřice byly v tomto případě provedeny servisním pracovištěm Parazitologického ústavu v Českých Budějovicích.

Pryskyřicové bloky předřežeme na skleněném noži, kde splavujeme řezy na vodní hladinu. Tyto polosilné řezy (např. 1 μm) průběžně sbíráme na podložní skla a po přischnutí je barvíme 30s roztokem methylové zeleně a pozorujeme ve světelném mikroskopu. Takto nalezneme část preparátu pro nás vhodnou k přípravu vlastních ultra tenkých řezů.

Takto připravené vzorky byly odeslány ke zpracování opět na servisní pracoviště. Zde vyhotoví ultratenké řezy (např. 60 nm), které jsou nanесeny na měděné nosiče a kontrastovány 2,5 % uranyl acetátem po dobu jedné hodiny a citrátem olova dalších 15 min. Zpracované vzorky jsou následně analyzovány na transmisním elektronovém mikroskopu (zde na Jeol – 1011) a jednotlivé fotografie snímány a zpracovány za využití vhodného softwaru (zde MEGAvIEW III Soft).

### **6.3.4 Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii**

Roztoky: 4% PFA v PBS; etanolová řada (30, 50, 70, 80, 90, 95 a 100%); aceton

Přístrojové vybavení: komora pro vysoušení metodou kritického bodu; napařovací aparatura; řádkovací elektronový mikroskop SEM JEOL 6700 F

Software: MEGAvIEW III Soft

Postup: Rhopalia fixovaná v 4% PFA v PBS (vhodnější by byla dvojitá fixáž glutaraldehydem a oxidem osmičelým) dehydratujeme ethanolovou řadou (30, 50, 70, 80, 90, 95 a 100 %; 10 min na krok). Ze 100% EtOH vzorky převedeme do acetonu a vysušíme je metodou kritického bodu. Vysušené vzorky nalepíme oboustrannou uhlíkovou páskou na hliníkové terče a pozlatíme. (K pozlacení bylo u preparátu *T. c.* využito vakuového napařování s vrstvou na povrchu preparátu o tloušťce 10 - 20 nm.) Preparáty hodnotíme ve skenovacím elektronovém mikroskopu SEM JEOL 6380LV a obraz digitálně snímáme a zpracujeme softwarem MEGAvIEW III Soft.

### **6.3.5 Příprava homogenizátů z čoček a celých rhopalií pro SDS PAGE**

Materiál: dospělé medúzy *Tripedalia cystophora* v RNA later; pinzety; mikronůžky; plastový dřík pro homogenizaci v 1,5 ml mikrozkumavce

Roztoky: PBS; 4x nanášecí pufr pro SDS PAGE: 0,0625M Tris pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0,7M βME, 0,00125% bromfenolová modř

Přístrojové vybavení: stereolupa

Postup: Ze senzorických dutin *T. c.* vyjmeme pomocí pinzety jednotlivá rhopalia. Rhopalia přeneseme do PBS, krátce je opláchneme a přeneseme do mikrozkušavky, ze které následně odstraníme téměř všechny PBS tak, aby na dně zůstala rhopalia ponořena v PBS (asi 40 µl/10 rhopalií). Rhopalia homogenizujeme plastovým dříkem pro homogenizaci v 1,5 ml mikrozkušavkách. Dřík opláchneme menším množstvím PBS do mikrozkušavky a vzorek po přidání 4x nanášecího pufru povaříme 5 min při 100°C.

Pro izolaci čoček rhopalia přeneseme do roztoku PBS pod stereolupou a tlakem na pigmentovou vrstvu retiny pod čočkou se pokoušíme čočku uvolnit (cca 200 µm). Volné čočky zbavíme mikronůzkami veškerých zbytků retiny (tak, aby byly v kvalitě jako na Obr. 10 C) a přeneseme do mikrozkušavky. Z mikrozkušavky odsajeme maximum PBS, které bylo nasáto při přenášení čoček a čočky homogenizujeme plastovým dříkem pro homogenizaci v 1,5 ml mikrozkušavkách. Po homogenizaci špičku dříku opláchneme malým množstvím PBS tak, aby v mikrozkušavce zůstal veškerý materiál. Přidáme odpovídající množství 4x nanášecího pufru a vaříme 5 min 100°C.

### 6.3.6 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Materiál: 2-merkptoethanol (βME); Tris; glycerol; dodecylsulfát sodný (SDS); bromfenolová modř (BFB); glycin; ethylendiamintetraacetát sodný (EDTA); 30% akrylamid/bis – akrylamid (29:1); persíran amonný; N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin (TEMED); Simply Blue SafeStain

Roztoky: elektrodový pufr: 0,125 M Tris, 1,04 M glycin, 0,5% SDS, pH 8,3; nanášecí pufr 4x: 0,0625 M Tris pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0,7 M βME, 0,00125% BFB; Simply Blue SafeStain; isopropanol

**Tab. 1:** Separační gel (10 ml; objemy v ml):

Složka	Koncentrace polyakrylamidu					
	6%	8%	10%	12%	15%	18%
H <sub>2</sub> O	5,3	4,6	4,0	3,3	2,3	1,3
30% směs akrylamidu	2,0	2,7	3,3	4,0	5,0	6,0
1,5M Tris pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10% persíran amonný	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,005	0,005



Zaostřovací gel (4 ml): 2,7 ml H<sub>2</sub>O, 0,67 ml 30% směs akrylamidu, 0,5 ml 1M Tris pH 6,8, 0,04 ml 10% SDS, 0,04 ml 10% persíran amonný, 0,004 ml TEMED

Přístrojové vybavení: elektroforetická jednotka, vana a elektroforetický zdroj (systém Protean II)

Postup: Připravíme aparaturu na lití gelu a nanese separační gel. Separační gel připravíme těsně před nalitím dle Tab. 1 a to v koncentraci odpovídající optimálnímu dělení studovaných proteinů. Jednotlivé složky přidáváme v pořadí dle tabulky (voda až TEMED) a po přidání TEMED roztok zamícháme a nalijeme mezi skla. Hladinu vyrovnáme převrstvením 1 mm vrstvou isopropanolu a necháme ztuhnout cca 30 min. Připravíme zaostřovací gel. Odstraníme isopropanol a nalijeme zaostřovací gel (alespoň 1,5 cm gelu mezi dolním okrajem hřebenu a separačním gelem); ponoříme hřeben pro tvorbu nanášecích jamek. Ponecháme 20 min ztuhnout, vyjmeme hřeben a jamky vypláchneme nejlépe elektrodovým pufr. Připravíme elektroforetickou vanu, vložíme elektroforetickou jednotku se založenými skly (nebo sklem a vycpávkou) a vlijeme elektrodový pufr. Vzorky pro separaci vaříme 5 min 100°C s nanášecím pufr (3:1). Po nanesení směsi standardů molekulových hmotností nanášíme do dalších jamek považené vzorky (některé standardy MW je také třeba vařit). Vlastní separaci provádíme nejprve při konstantním napětí 100 V a po průchodu zaostřovacím gelem zvyšujeme na 200 V. Po separaci aparaturu rozebereme a vyjmeme gel, který následně zpracujeme dle potřeby. Pro Western blot jej 3 min inkubujeme ve vaničce s destilovanou vodou a rovnou vkládáme do připraveného sendviče pro přenos proteinů na membránu.

Pokud potřebujeme barvit separované proteiny v gelu, lze postupovat následovně. Gel třepeme 3x 5 min v destilované vodě, vodu odstraníme a gel přelijeme Simply Blue SafeStain roztokem. Inkubujeme 1 hod při pokojové teplotě a poté barvicí roztok odlijeme. Gel třepeme ve vaně s destilovanou vodou, kterou měníme, dokud oblast mezi vzorky (prázdný gel) není zcela transparentní.

### **6.3.7 Western blot s chemiluminiscenční detekcí**

Pro kontrolu specifity protilátek proti J1 a J2 krystalinu byly pro imunochemickou detekci proteinů na membráně (Western blot, imonoblot) použity homogenizáty z rhopalií. Pokud není uvedeno jinak, všechny inkubace probíhají při pokojové teplotě. Pro vizualizaci byla vždy použita sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (anti králík v tomto případě) a chemiluminiscenční reakce.

Materiál: nitrocelulózová mambrána; primární protilátka; sekundární protilátka anti králík (či anti myš ap.) konjugovaná s HRP; filmy vhodné pro detekci chemiluminiscence aj. (MEDIX XBU medical X – ray film); kazeta pro expozici filmů; filtrační papír; potravinová fólie

Roztoky: transferový pufr: 25 mM Tris, 160 mM glycin, 0 - 20% MeOH (MeOH přidáváme pro lepší přenos malých proteinů, zpravidla postačuje 10% MeOH; pro PVDF membrány lze max. 15% MeOH) pH 8,3 – 8,4; PBT; 5% sušené mléko v PBT; 3% BSA v PBT; SuperSignal West Pico Luminol - posilovač; SuperSignal West Pico stabilní peroxidový roztok

Přístrojové vybavení: vyvolávací automat Kodak X-OMAT 1000

Postup: Po separaci proteinů v gelu, gel inkubujeme 10 min v transferovém pufru (odstranění SDS ap.) a vložíme do připraveného, puftrem nasáklého sendviče pro přenos proteinů na membránu. Pro přenos v roztoku (mokrý blot) sestavujeme sendvič následovně (+) houba, tlustý filtrační papír (Whatman ap.), membrána (např. nitroceluózová), gel, tlustý filtrační papír, houba (-). (+) značí anodu a (-) katodu. Transfer probíhá přes noc při 20 V nebo např. 3 hod při 45 V. Po přenosu membránu opláchneme 5 min v dH<sub>2</sub>O (úspěšnost přenosu a polohu markeru můžeme vizualizovat inkubací s 1x Ponceau S roztokem (Fluka) a následně odmyt dH<sub>2</sub>O s kapkou 10M NaOH) a inkubujeme 1 hod v 3% BSA v PBS (blokace nespecifických vazeb protilátek - vysycení membrány). Následně přeneseme do roztoku primární protilátky ředěné v 5% mléce v PBT a inkubujeme 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C. Koncentrace primární protilátky je specifická, jak pro tkáň, tak pro protilátku. U krystalinových protilátek bylo pro kontrolu jejich specifity použito ředění 1:500.

Po inkubaci nenavázanou protilátku odstraníme třemi 10 min oplachy PBT. Sekundární protilátku ředíme v 5% mléce v PBT 1:3000 (anti – králík) či 1:1000 (anti – myš) a inkubujeme s membránou 1 hod. Po inkubaci odmyjeme sekundární protilátku třemi oplachy PBT po 15 min větším objemem roztoku (alespoň 1 cm roztoku nad promývanou membránu umístěnou na dně plastové vaničky přibližně o jejím rozměru). Pro vlastní vizualizaci signálu smísíme stejná množství luminolu a peroxidu (SuperSignal West Pico systém) a nalijeme na membránu. Po deseti minutách roztok kompletně odstraníme, membránu osušíme mezi filtračními papíry a zabalíme do potravinové fólie. Radiografický film exponujeme nejprve 1 min a délku expozice upravíme dle výsledku. Filmy vyvoláme např. vyvolávacím automatem Kodak X-OMAT 1000.

### **6.3.8 Příprava králičích polyklonálních protilátek**

V našem případě se jednalo o přípravu protilátek proti jednotlivým proteinům. Příprava se sestává z následujících kroků, které budou popsány samostatně: příprava expresního vektoru; exprese rekombinantního proteinu; izolace rekombinantního proteinu a imunizace králíka. Nejprve je tedy připraven a izolován protein, kterým je králík imunizován. Sérum králíka je po jednotlivých imunizacích testováno a následně je králík zcela odkrven a sérum sklizeno. Protilátky ze séra mohou být ještě dále purifikovány.

### 6.3.8.1 Příprava expresního vektoru

Výchozím materiálem je plazmid s vloženým kompletním čtecím rámcem genu (v našem případě), který budeme následně fúzovat s kotvou pro afinitní purifikaci. Navrhujeme primery na kraje inzertu tedy tak, aby výsledný PCR produkt obsahoval kompletní čtecí rámec obklopený z obou stran restrikčními místy. Tato místa mají umožnit nejlépe jeho orientované vložení do některého z plazmidů systému pET (použit v rámci tohoto projektu) a to bez posunu čtecího rámce. PCR produkt štěpíme danými restrikčními enzymy a vkládáme do expresního vektoru systému pET např. pET – 42a (+) tak, aby nebyl posunut čtecí rámec. V tomto typu vektorů se za T7 promotorem nachází GST (glutathion-S-transferáza) kotva a 6xHis (hexahistidinová) kotva (popřípadě pouze 6xHis kotva), dále následuje poly-linker pro vkládání inzertů, za ním případně další 6xHis kotva a T7 terminátor. Po inzerci do expresního plazmidu a jeho amplifikaci v běžných *E. coli* TOP10, izolujeme připravený plazmid (minipreparací a pro vlastní transformaci maxipreparací) a transformujeme jím upravený kmen *E. coli* BL21(DE3)RIPL (v našem případě).

Následuje popis obecných metod využívaných při přípravě plazmidu pro produkci rekombinantního proteinu aj.

#### *PCR na plazmidovém templátu*

**Materiál:** DNA polymeráza dle požadavků na metodu (zda ověřujeme přítomnost nebo orientaci inzertu či připravujeme inzert na vložení pro expresi rekombinantního proteinu apod.; nejčastěji *DyNAzyme*, *Taq* či *Advantage*); 10x PCR pufr obsahující  $MgCl_2$  - dodaný výrobcem polymerázy; 10mM dNTP (směs deoxynukleotidů, každý 10mM); ddH<sub>2</sub>O (pH 7,0); templát (plazmid); primery

**Přístrojové vybavení:** termocyklér PTC – 200

**Postup:** Připravíme reakční směs, tak že finální koncentrace jednotlivých složek je následující: 1x PCR pufr, 0,4mM dNTP (každý), 0,5 μM primery (každý), polymeráza (*Taq*) 1 – 2,5 U/50 μl reakci, DNA templát cca 100 ng/50 μl reakci. Případně modifikujeme podle potřeby. Vše smícháme na ledu (v případě protilátkové *Taq* polymerázy to není nutné, naopak začleníme první 3 min denuraci při 98°C) a polymerázu pipetujeme poslední. Vložíme do termocykléru předehřátého na 98°C denaturujeme 1 min a spustíme následující program: 98°C 30 s,  $t_{m \text{ primerů}} - 3^\circ C$  45 s, 72°C 1min/1kb (pro *Advantage* 68°C); opakujeme 20x. Po posledním kroku zařadíme 10 min 72°C a 4°C až do zpracování produktů.

#### *Purifikace PCR produktů*

**Materiál:** QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

**Postup:** Postupujeme přesně dle protokolu dodaného výrobcem.

### *Restrikční štěpení*

Nejčastěji využíváme pro kontrolu inzertů a jejich orientace, úpravu PCR produktů a linearizaci vektorů pro ligaci.

Materiál: restrikční enzym; 10x odpovídající pufr doporučený výrobcem enzymu; dH<sub>2</sub>O; štěpená DNA; 100x BSA (10 mg/ml)

Roztoky: nanášecí pufr: 0,25% bromfenolová modř, 0,25% xylen cyanol FF, 30% glycerol

Postup: Připravíme 30 µl restrikční reakci: štěpená DNA, 1x pufr, enzym nejméně 1U/1 µg DNA, 1x BSA, voda. Inkubujeme 1 hod při teplotě doporučené výrobcem enzymu. Při štěpení dvěma restrikčními enzymy hledáme pufr vyhovující oběma, případně štěpíme nejprve enzymem vyžadujícím nižší iontovou sílu a po 1 hod koncentraci upravíme, přidáme enzym druhý a inkubujeme další hodinu. Pokud chceme izolovat některý z fragmentů, k restrikční reakci přidáme nanášecí (vzorkový) pufr pro agarózovou elektroforézu a nanese. Po separaci v agarózovém gelu o vhodné koncentraci (např. 0,7% pro fragmenty 0,8 – 10 kb), izolujeme žádaný fragment. Před izolací můžeme v případě potřeby defosforylovat např. štěpený plazmid.

### *Defosforylace vektoru:*

Po štěpení, ale před izolací z gelu, defosforylujeme linearizovaný vektor, který se chystáme použít pro ligaci s inzertem. Zabráníme tak recirkularizaci prázdného vektoru.

Materiál: alkalická fosfatáza CIP (*calf intestine phosphatase*, původem z telecího střeva) (10 U/µl)

Postup: Po restrikčním štěpení přidáme k reakci (o standardním objemu 30 µl) 1 µl fosfatázy a inkubujeme ještě 30 minut.

### *Izolace DNA z gelu:*

Materiál: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

Postup: Postupujeme přesně dle protokolu dodaného výrobcem.

### *Ligace plazmid/inzert*

Materiál: T4 DNA ligáza (10U/µl); 10x T4 DNA ligázový pufr; ddH<sub>2</sub>O; linearizovaný defosforylovaný plazmid; inzert (připravený pro ligaci s daným plazmidem)

Postup: Připravíme 20 µl reakci obsahující 1x T4 DNA pufr, 10 – 100 ng plazmidové DNA, ekvimolární množství vkládané DNA a 1 µl T4 DNA ligázy. Inkubujeme 1 – 4 hod (případně i déle) při 16°C. Vždy připravujeme i kontrolní reakční směs, která neobsahuje inzert.

Ligační směs použijeme k transformaci kompetentních buněk.

### *Transformace E. coli TOP10*

Materiál: kompetentní buňky *E. coli* TOP10; agarová plotna s příslušným antibiotikem (ampicilin 100 µg/ml; kanamycin 25 µg/ml ap.); sterilní roztírací očko; plazmid či ligační směs

Postup: Kompetentní buňky rozmrazíme na ledu 10 min a ke 100 µl kompetentních buněk přidáme 1 µl standardní plazmidové minipreparace či část ligační směsi (10 ng – 1 µg DNA). Zamícháme a na ledu inkubujeme 10 min. Vystavíme teplotnímu šoku 42°C 40s a inkubujeme dalších 30 min na ledu. Směs nakapeme na agarovou plotnu a pečlivě rozetřeme roztíracím očkem. Pokud se jedná o plazmid nesoucí např. kanamycinovou či jinou resistenci pro kterou je buňky třeba adaptovat, přidáme před rozetřením na agarovou plotnu 900 µl LB média a 1 hod třepeme při 37°C 220 rpm. Po inkubaci stočíme 2 min 4000g a pelet rozsuspendujeme v 100 µl LB média a rozetřeme na agarovou plotnu s kanamycinem. Inkubujeme vzhůru nohama při 37°C. Druhý den vyjmeme z termostatu a zpracujeme či uložíme při 4°C.

#### *Transformace E. coli BL21(DE3)RIPL plazmidy systému pET*

Materiál: kompetentní buňky *E. coli* BL21(DE3)RIPL; LB agarová plotna s kanamycinem (25 µg/ml); sterilní roztírací očko; plazmid

Postup: Postup je obdobný jako u předchozího avšak s modifikacemi, protože BL21 jsou obtížně transformovatelné. Po rozmražení kompetentních buněk BL21(DE3)RIPL (tj. buněk s IPTG indukibilní T7 RNA polymerázou, defektními proteázami OmpT a Lon a přizpůsobením pro eukaryotický „codon usage“ pro Arg, Ile, Pro a Leu) a po přidání plazmidu (nelze transformovat přímo ligační směsí) inkubujeme buňky na ledu 30 min a poté je vystavíme teplotnímu šoku pouze na 20s. Vždy začleníme inkubační krok (příprava na selekční podmínky) před výsevem na agarovou plotnu. Podle některých protokolů se doporučuje přidat k buňkám před přidáním plazmidu 1mM βME.

#### *Minipreparace plazmidové DNA (miniprep)*

Materiál: isopropanol (IPA); LB médium

Roztoky: pufr P1: 50 mM glukóza, 25 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA; pufr P2: 0,2 M NaOH, 1% SDS; pufr P3: 3 M octan draselný, 11,5% kyselina octová; TER pufr: 0,1 mg RNáza A/ml TE; TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0; 70% EtOH

Přístrojové vybavení: stolní mikrocentrifuga Eppendorf Centrifuge 5417C; třepačka na mikrozkušavky Eppendorf Thermomixer comfort

Postup: Pokud není uvedeno jinak, jednotlivé kroky probíhají při pokojové teplotě. 2 ml LB média s příslušným selekčním agens (antibiotikem, např. ampicilin 100 µg/ml) zaočkujeme jedinou kolónií z agarové plotny. Přes noc třepeme 200 rpm 37°C. Druhý den ráno ihned zpracujeme nebo uložíme při 4°C. Obsah přelijeme do 2 ml mikrozkušavek a centrifugujeme 2 min 6000 rpm. Pelet (odstraníme supernatant) rozsuspendujeme v 300 µl pufru P1, necháme 5 min stát. Přidáme 300 µl

P2 a několikrát jemně obrátíme, inkubujeme 5 – 10 min. Přidáme 300 µl P3, opět několikrát jemně obrátíme a inkubujeme 10 min. Stočíme 12000 rpm 7 min a do mikrozkušavky s 600 µl IPA přeneseme čirý supernatant. Protřepeme a inkubujeme 5 min. Centrifugujeme 12000 rpm 7 min, zkontrolujeme přítomnost peletu a obsah (roztok) odstraníme. Pelet opláchneme 150 µl 70% EtOH. Odstraníme EtOH a sušíme 30 min 37°C. Po sušení pelet rozpustíme v 50 µl TER pufru (degradace RNA) za stálého třepání 1000 rpm při 37°C 30 min.

#### *Maxipreparace plazmidové DNA (maxiprep)*

**Roztoky:** pufr P1: 50 mM glukóza, 25 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA; pufr P2: 0,2 M NaOH, 1% SDS; pufr P3: 3 M octan draselný, 11,5% kyselina octová; TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0; TER pufr: 0,1 mg RNáza A/ml TE; 10 M LiCl; 80% EtOH; 96% EtOH; 5M NaAc; LB médium; EB pufr; ddH<sub>2</sub>O

**Materiál:** isopropanol (IPA); fenol; chloroform; ampicilin aj.

**Přístrojové vybavení:** stolní mikrocentrifuga Eppendorf MicroSpin plus (v textu označeno E), cetrifuga na 50ml zkumavky Hettich Universal 32 R (H)

**Postup:** Pokud není uvedeno jinak, probíhají jednotlivé kroky při pokojové teplotě. Z jediné kolonie zaočkujeme 50 ml LB média s přídavkem odpovídajícího antibiotika a kultivujeme na třepačce (200 rpm) při 37°C přes noc. Stočíme v 50 ml kyvetě 15 min 4°C 3500 rpm (H) a pelet resuspendujeme v 5 ml pufru P1. Ponecháme na ledu 5 min. Přidáme 10 ml pufru P2, jemně promícháme a inkubujeme na ledu 3 min (2x mícháme). Přidáme 7,5 ml pufru P3, opět jemně promícháme a na ledu inkubujeme 10 min s občasným mícháním. Centrifugujeme 15 min 3500 rpm 4°C (H). Odebereme supernatant a přidáme 0,7 objemu IPA, protřepeme a necháme stát 10 min při pokojové teplotě. Centrifugujeme při 4°C 15 min 3500 rpm (H). Pelet resuspendujeme v 0,7 ml 80% EtOH a přeneseme do mikrozkušavky. Zkušavku vypláchneme ještě 0,5 ml 80% EtOH a spojíme s 0,7 ml 80% EtOH. Centrifugujeme 2 min 13000 rpm (E). Pelet resuspendujeme v 350 µl TE pufru a přidáme 100 µl 10M LiCl, vortexujeme a inkubujeme 10 min při pokojové teplotě. Centrifugujeme 3 min 13000 rpm (E) a supernatant přeneseme do nové 1,5 ml mikrozkušavky, kde objem doplníme do 600 µl pufrům TE. Extrahujeme 600 µl směsi 1:1 fenol:chloroform (vortexujeme). Centrifugujeme 5 min 13000 rpm (E) a k odebrané vodné fázi přidáme 0,7 objemu IPA. Protřepeme a inkubujeme 10 min 20°C. Po centrifugaci 5 min 13000 rpm pelet opláchneme 0,5 ml 80% EtOH a usušíme. Suchý pelet resuspendujeme v 200 µl TER 30 - 45 min při 37°C. Po inkubaci přidáme 160 µl TE, 40 µl 5m NaAc a 400 µl směsi 1:1 fenol:chloroform. Vortexujeme 30 s a stočíme 2 – 3 min 13000 rpm (E). K odebrané vodné fázi přidáme 1 ml (2,5 objemu) 96% EtOH, protřepeme a inkubujeme 10 min při pokojové teplotě. Centrifugujeme 5 min 13000 rpm (E) a pelet po oplachu 0,5 ml 80% EtOH sušíme 30 min při 37°C. Usušený pelet rozpustíme v 100 µl ddH<sub>2</sub>O či EB pufru.

### 6.3.8.2 Exprese rekombinantního proteinu v *E. coli* BL21(DE3)RIPL

Materiál: BL21(DE3)RIPL (konzerva; kanamycinová rezistence na plazmidu); LB médium; kanamycin; chloramfenikol; IPTG; 2l kónická nádoba

Přístrojové vybavení: centrifuga Hettich Universal 32 R; třepačka Galenkamp

Postup: Z konzervy BL21(DE3)RIPL transformovaných naším plazmidem z řady pET zaočkujeme 1:200 10 ml LB média s chloramfenikolem (50 µg/ml) a kanamycinem (25 µg/ml). Třepeme přes noc 220 rpm při 37°C. Ráno zaočkujeme 250 ml LB média vytemperovaného na pokojovou teplotu 1:100 tímto inokulem. Nepřidáváme již selekční činidla. Třepeme ve 2l skleněné kónické nádobě dokud kultura nedosáhne OD<sub>600</sub> 0,6 – 0,8 (v některých případech vyhovuje až 1,0). Transkripci T7 RNA polymerázy a následně tedy transkripci našeho inzertu indukujeme přidáním 0,1 – 1mM IPTG. Po indukci dále třepeme 2,5 - 3 hod. Je-li protein pro buňky toxický lze tuto dobu zkrátit anebo případně snížit teplotu inkubace. V běžném případě buňky po 2,5 – 3 hod stočíme při 4°C 3500g 15 min, supernatant odlijeme a pelet (buňky s produkovaným rekombinantním proteinem) zamrazíme při -80°C.

### 6.3.8.3 Afinity purifikace rekombinantního proteinu s 6xHis kotvou

Materiál: buňky *E.coli* obsahující rekombinantní protein s 6xHis kotvou; βME; NiNTA agaróza; BioRad protein assay (Bradfordův test)

Roztoky: pufr A: 6 M guanidinium hydrochlorid (GuaCl), 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris pH 8,0; pufr B: 8 M močovina, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris pH 8,0, pufr C: jako B pH 5,9; pufr D: jako B pH 4,5 (případně 4,0); 1 M Tris-Cl pH 8

Přístrojové vybavení: centrifuga Hettich Universal 32 R (H); velká centrifuga Beckman J2 – 21M (B)

Postup: Protein izolujeme nejlépe z většího výchozího množství kultury (0,5 – 1l). Například pro imunizaci jednoho králíka budeme potřebovat nejméně 1 mg proteinu, který izolujeme alespoň z 0,5 l kultury. Pelety s buňkami s produkovaným proteinem (indukci ověřujeme na SDS PAGE) necháme roztát na ledu a přidáme 50 ml pufru A s 10 – 20 mM βME na 1l výchozí kultury. Pelet rozsuspendujeme a buňky necháme lyzovat (rotujeme v plastové zkumavce) 3 hod při pokojové teplotě (pokud nejsou buňky dostatečně lyzovány můžeme ponechat přes noc). Lyzát stočíme 10000 rpm (B) 10 min při 4°C (odstranění zbytků buněčných stěn apod.) a odebereme supernatant. NiNTA vazebnou matici ekvilibrujeme v pufru A (tři promytí s inkubacemi 5, 10 a 15 min). Deset objemů pufru A použijeme na jeden objem matrice. Ekvilibrované NiNTA kuličky smísíme se supernatantem po buněčné lýzy a necháme navazovat rekombinantní protein na tuto matici (koordinace niklu šesti histidiny) 3 hod – přes noc. Směs necháme prokapat skrz 10 ml kolonu s

„fritou“ (zachycení kuliček) nebo kuličky stočíme na dno. NiNTA matrici pak promýváme pufrem A s 10 – 20mM  $\beta$ ME dokud se nepřestanou uvolňovat nespecificky navázané proteiny a zbytky lyzátu (kontrola Bradfordovým testem pro proteiny; postupujeme dle návodu výrobce). Dále pracujeme s NiNTA matricí (agarózovými kuličkami) na koloně. Kuličky začneme promývat pufrem B s 10 - 20mM  $\beta$ ME a sledujeme odmyvájící se nespecificky navázané proteiny v odtékajícím roztoku pomocí Bradford testu. Po odmytí všech těchto proteinů promýváme roztokem C s 10 - 20mM  $\beta$ ME, a to opět až do odstranění všech nespecificky navázaných proteinů. Rekombinantní protein z NiNTA matrice uvolníme elučním pufrem D. Standardně provádíme tři eluce objemem 0,5 – 1 ml pufru D s 10 - 20mM  $\beta$ ME na jednu. Pokud i ke konci třetí eluce stále odtéká protein (kontrola Bradford testem) přidáme další eluci atd. Pokud se protein neuvolňuje, zkusíme snížit pH na 4,0. Eluáty sbíráme zvlášť do mikrozkuhavek, pH upravíme na pH 7 – 8 (přidáním 1M Tris pH8 – asi 100 $\mu$ l/ml) a určíme koncentraci proteinů. Pro injekci do králíka naředíme tak, aby výsledná koncentrace močoviny byla 6M.

V průběhu celé metody odebíráme po každém kroku vzorky, tak abychom mohli hodnotit při neúspěšné izolaci mezi kterými kroky došlo k chybě (např. protein zůstal navázan na kuličkách, zůstal v supernatantu apod.)

#### **6.3.8.4 Imunizace králíka**

**Materiál:** Novozélandský bílý králík – naivní samice 1,8 – 2,2 kg; Freundovo kompletní a nekompletní adjuvans; purifikovaný protein (antigen); injekční stříkačky a jehly; desinfekce; thimerosal či jiná antimikrobiální přísada do séra; glycerol

**Postup:** Dva dny před první imunizací odebereme králíkovy preimunní sérum. Králíkovi jsou následně injekčně mezi lopatky aplikovány tři dávky antigenu (300 – 500  $\mu$ g na aplikaci) s třítydenními rozestupy. (Mezi druhou a třetí imunizací se obvykle interval zkracuje na 2 týdny). Pro první, počáteční imunizaci je voleno kompletní adjuvans (podpora excitace imunitního systému), další dávky jsou s nekompletním adjuvans. Vždy lze aplikovat maximálně 1 ml roztoku z čehož 0,5 objemu vždy činí adjuvans. Po jednotlivých imunizacích (zejména po druhé a každé další dávce) testujeme kontrolní sérum (odběr z ucha), je – li již pozitivní na naše protilátky. Po třetí imunizaci (je-li v sérum dostatečně vysoký titr požadovaných protilátek) je králík usmrcen a vykrváčen a separované sérum je uschováno při -80°C, jako alikvóty v 4°C s antimikrobiální přísadou či v -20°C s 50% glycerolu. Kontrolní séra odebíráme osmý den po imunizaci a do dvanáctého dne lze králíka vykrváčet s ještě vysokým titrem protilátek v krvi.



### 6.3.9 Příprava mrazových řezů pro IHC (imunohistochemie) a RNA ISH

Optimalizováno pro řezy tkáněmi medúzy.

Materiál: zalévací médium pro mrazové řezání (Jung); plastová okénka pro zalévání tkání (1 cm x 1 cm x 0,5 cm); poly-L-lysinovaná podložní skla SuperFrost Plus

Roztoky: 30% sacharóza v PBS

Přístrojové vybavení: Kryostat Leica CM3050 S; mikroskop Olympus IX70

Postup: Po fixaci (nejčastěji 4% PFA v PBS, skladování ve fixáži při 4°C) tkáň ekvilibrujeme v 30% sacharóze 4 - 6 hod při pokojové teplotě či přes noc při 4°C. Tkáň vložíme do zalévacího okénka a při pokojové teplotě vyplníme okénko zalévacím médiem a tkáň naorientujeme. Okénko umístíme do kryostatu a při teplotě -23°C ponecháme 30 min (polymerace zalévacího média, ztuhnutí). Vyjmeme obsah okénka a nalepíme jej na terč pro preparát pomocí kapky zalévacího média a ponecháme ztuhnout dalších 15 min. Terč upneme do držáku (u přístroje Leica CM3050 S je pohybováno při řezání vzorkem a nikoli nožem) a nastavíme pozici preparátu tak, aby se již téměř dotýkal nože. Nastavíme režim řezání TRIM (hrubé skrajování), tloušťku řezů nastavíme nejprve na 10 µm a když je již skrajována celá plocha preparátu, nastavíme 30 µm i více. Po prořezání přebytečného média, řezy tkáněmi sbíráme a vizuálně pod mikroskopem kontrolujeme. Na zvoleném místě řezy odebíráme na označená podložní skla. Poly-L-lysinované sklo (pozitivní náboj) postačí přiložit nad řez na noži a ten je na sklíčko přitažen a přilepen (sklo je teplé, zalévací médium ihned taje). Skla necháme na vzduchu 30 min zaschnout a skladujeme v -20°C maximálně rok; vhodné je však připravit pro experiment vždy řezy nové. Pro IHC volíme tloušťku řezů 8 - 10 µm, pro RNA ISH 15 – 20 µm. Pokud připravujeme řezy na RNA ISH pracujeme po celou dobu v rukavicích a s roztoky a podložními skly pro to určenými (pokud možno bez RNáz atd.).

### 6.3.10 IHC – imunohistochemie na mrazových řezech

Metoda určená k vizualizaci studovaných epitopů (např. specifických krystalinů čočky) založená na interakci protilátka – antigen (epitop). Po vazbě primární specifické protilátky (polyklonální nebo monoklonální) na studovaný cíl (antigen) jej vizualizujeme pomocí druhé (sekundární) protilátky, která rozeznává těžký řetězec primární protilátky, specifický pro zvíře, ve kterém byla protilátka připravena. Tato sekundární protilátka je konjugována zpravidla s fluorescenční značkou (přímé pozorování ve fluorescenčním mikroskopu) nebo enzymem, který po přidání substrátu katalyzuje reakci s výsledným barevným produktem (pozorování ve světelném mikroskopu). Následující postup je určen pro první případ, sekundární protilátku konjugovanou s fluorescenční značkou, což byla metoda použitá v této práci.

V rámci charakterizace exprese krystalinů *T. c.* byly použity celkem tři protilátky: připravené anti J1 a J2 králičí polyklonální protilátky a protilátka J1 - P, což je protilátka připravena proti J1

krystalinu a poskytnutá Prof. J. Piatigorskym (NIH NEI, USA). Pokud není uvedeno jinak, byly vždy použity nově připravené protilátky.

Materiál: DAPI (10mg/ml); Alexa Fluor 594 nebo 488 *highly cross-adsorbed* (2mg/ml) koza anti - králik; primární protilátky králičího původu

Roztoky: PBS; PBT; 4% PFA v PBT; 10% BSA (bovinní sérum albumin) v PBT; 1% BSA v PBT; 87% glycerol; 10mM citrát sodný pH 6

Přístrojové vybavení: fluorescenční mikroskop Nikon Diaphot 300 s odpovídajícími filtry; monochromatická CCD kamera VDS 1300

Software: Lucia IMAGE software; Adobe Photoshop CS; Adobe Illustrator CS

Postup: Skla se vzorky necháme zaschnout při pokojové teplotě nejméně 30 minut. Odmyjeme zalévací médium dvěma oplachy PBS (na skla roztoky pomalu kapeme injekční stříkačkou, tak aby se neodplavily řezy). Tkáň refixujeme 10 min 4% PFA v PBS, roztok odstraníme a oplachujeme 1x PBS. Aplikujeme roztok PBT na 15 min (permeabilizace vzorku a lepší smáčení skla). Pokud je potřeba odmaskovat např. fixací a jinak skryté antigeny (zpravidla jaderné) povaříme skla v 1 mM citrátu sodném o pH 6 (1 – 10 min) a necháme 20 min vychladnout. Citrát odmyjeme třemi oplachy PBS a pokračujeme ve standardním protokolu. (Lze aplikovat i jiné odmaskovací techniky jako např. 10 min inkubace s 0,5% SDS; povaření v roztoku 10 mM EDTA pH 8; enzymatické opracování proteinázou K aj.). Nespecifickou vazbu protilátek blokuje inkubací skla s řezy v 10% BSA v PBT nejméně 30 min. Po odstranění roztoku rovnou aplikujeme primární protilátky ředěné v 1% BSA v PBT (ředění je specifické pro protilátku, tkáň i účel a zpravidla se pohybuje v rozsahu 1:100 až 1:2000). Délka inkubace s primární protilátkou je též variabilní, většinou volíme nejméně 2 hod při pokojové teplotě, lépe však inkubaci přes noc při 4°C. Po inkubaci odmyjeme nenavázané protilátky třemi oplachy PBS, vždy ponecháme pět minut odmývat. Skla po odmytí primární protilátky inkubujeme se sekundární protilátkou odpovídajícího typu (na primární protilátku králičího původu použijeme sekundární protilátku proti králíkovi). Uvedené Alexa Fluor protilátky ředíme 1:500 v 1% BSA v PBT a inkubujeme s nimi řezy 30 až 60 min. Po odstranění sekundární protilátky opláchneme 3 x skla PBS, vždy 5 min nechat odmývat. Místo třetího oplachu lze inkubovat 10 min s roztokem DAPI 1:1000 v PBS a dobarvit tak modře (fluorescence) jádra. Po inkubaci s DAPI skla ještě opláchneme PBS a montujeme do 87% glycerolu.

Optimalizace pro zvýšení specifity protilátky: Postupujeme podle protokolu s tím rozdílem, že primární protilátku výrazně více naředíme (1:10000 – 1:100000) ve velkém objemu (např. 30 ml 1% BSA v PBS) a inkubujeme při 4°C 48hod i více. Použito pro J1 krystalinovou protilátku; ředění 1:10000.

Vyhodnocení: Vzorky pozorujeme na inverzním fluorescenčním mikroskopu Nikon Diaphot 300. Posoudíme jak je získaný signál specifický (např. dle očekávané lokalizace: membrána, cytoplazma, jádro atd.) a zda pozadí není příliš vysoké. Případně můžeme upravit postup barvení (naředit primární protilátku, lépe blokovat, zařadit odmaskování skrytých antigenů apod.). Výsledky dokumentujeme monochromatickou kamerou VDS 1300 ovládanou softwarem Lucia IMAGE a snímky dále upravujeme v programech Adobe Photoshop CS a Adobe Illustrator CS.

### **6.3.11 IHC na blocích tkáně či celých jedincích**

Jako výchozí materiál použijeme vzorky přiměřené velikosti (např. rhopalium nebo juvenilní medúzu), protokol je koncipován původně pro embrya *Danio rerio*. Tkáně je nejlépe fixovat dle protokolu tj. BT fixativem, pokud to není možné, lze použít i vzorky fixované v 4% PFA v PBS.

Materiál: methanol; aceton; sérum (např. ovčí); primární protilátka; sekundární protilátka (obvykle konjugovaná s fluorescenční značkou např. koza anti králík Alexa Fluor 488 či 594); DAPI (10 mg/ml)

Roztoky: PBS; BT fixativum: 4% PFA, 4% sacharóza, 8mM CaCl<sub>2</sub> v PBS; PBDT: 1% DMSO, 1% BSA, 0,5% TritonX – 100 v PBS; 25% MeOH; 50% MeOH; 75% MeOH; 25% glycerol; 50% glycerol; 70% glycerol; DAPI (10 mg/ml)

Přístrojové vybavení: konfokální mikroskop Leica TCS SP5 AOBS TANDEM; fluorescenční mikroskop Nikon Diaphot 300

Software: Lucia IMAGE Software; Adobe Photoshop CS; Adobe Illustrator CS

Postup: Tkáně či jedince fixujeme 2 hod při pokojové teplotě nejméně deseti objemy BT fixativa. Oplachujeme několikrát PBS (10 – 20 min) a PBS nahradíme MeOH, ten ještě vyměníme za čerstvý (po několika minutách) a vše uložíme na 4 až 5 hod do -20°C. (Takto mohou být vzorky uloženy až po několik týdnů.). Tkáně hydratujeme v řadě methanolů (75%, 50%, 25%) s inkubacemi po pěti minutách a posléze opláchneme několikrát v destilované vodě. Tkáně zpřístupníme protilátkám inkubací v předchlazeném acetonu 7 – 10 min (dle velikosti vzorku) při -20°C. Po inkubaci aceton odstraníme a oplachujeme několikrát vodou. Vzorky inkubujeme 30 až 45 min v PBDT s 2% sérem (blokace nespecifických vazeb protilátek). Odstraníme blokační roztok a inkubujeme s primární protilátkou ředěnou v PBDT přes noc při 4°C. Pro J2 protilátku bylo použito ředění 1:1000 na juvenilní a dospělé medúzy a 1:500 pro metamorfujícího polypa. Roztok odstraníme a promýváme 2 hod PBDT při pokojové teplotě (nejméně 4 výměny roztoku). Ke vzorkům přidáme sekundární protilátku ředěnou v PBDT (1:500 pro Alexa Fluor) a inkubujeme 4 až 5 hod při pokojové teplotě. Sekundární protilátku odmyváme 2 hod PBDT roztokem (nejméně čtyři výměny roztoku). PBDT vyměníme za 25% glycerol a inkubujeme 30 minut, následuje tatáž

inkubace s 50% glycerolem a uskladnění v 70% glycerolu při 4°C či déle při -20°C. Pokud potřebujeme vizualizovat jádra, barvíme před převodem do glycerolu 10 min v roztoku DAPI 1:1000 v PBS či přidáme na závěr 1 µl DAPI na 1 ml 70% glycerolu.

Vyhodnocení: Obdobně jako při IHC na řezech, s výhodou však využijeme konfokální mikroskop a případně 3D rekonstrukce.

### **6.3.12 RNA *in situ* hybridizace**

Tato metoda umožňuje detekci specifické mRNA v tkáních, tedy umožňuje zhodnotit, kde je studovaný gen exprimován. Základem metody je příprava sondy (ribopróby) komplementární ke sledované mRNA. Tato sonda je syntetizována z nukleotidů s příměsí značených (např. digoxigeninových). Po hybridizaci ribopróby se vzorky vzniknou v místech, kde je gen exprimován stabilní duplexy, které vizualizujeme (a tím tedy místa transkripce studovaného genu) inkubací vzorků s protilátkou rozeznávající modifikované nukleotidy. Tato protilátka je konjugovaná s enzymem (např. alkalickou fosfatázou) a po přidání substrátu katalyzuje jeho přeměnu např. na barevný, snadno pozorovatelný produkt. Pro vlastní RNA *in situ* hybridizaci je nejprve potřeba připravit plazmid s inzertem podle kterého bude próba syntetizována a nasyntetizovat samu sondu.

#### **6.3.12.1 Příprava plazmidu pro syntézu próby na RNA *in situ* hybridizaci**

Plazmid pro syntézu ribopróby izolujeme maxipreparací z 50 ml kultury (viz výše), tedy s výslednou vyšší čistotou i koncentrací DNA oproti minipreparaci. Pro vlastní syntézu je třeba vektor linearizovat štěpením restriční enzymem, který nezanechává 3' přesahující konce. Plazmid štěpíme ve vhodném místě v bezprostřední blízkosti za transkribovaným inzertem (promotor – inzert – zvolené restriční místo). Toto štěpení je nezbytné pro ukončení syntézy próby (odpadnutí RNA polymerázy).

Materiál: plazmid s T3, T7 či SP6 promotory a inzertem pro syntézu próby (např. pBluescript II; pCR4Blunt-TOPO) restriční enzym; BSA 10 mg/ml; DEPC dH<sub>2</sub>O; QIA prep spin kolonky; EB pufr (10mM Tris – Cl, pH 7,4)

Přístrojové vybavení: inkubátor TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha)

Postup: Připravíme 50 µl reakci, do které vkládáme 20 µg plazmidu, 40U restričního enzymu, 0,5 µl BSA; objem doplníme DEPC vodou. Po zamíchání a stočení na dno mikroskopické inkubujeme 1,5 hod při teplotě doporučené výrobcem enzymu. Odebereme 5 µl štěpeného plazmidu jako kontrolu a zbytek přečistíme na QIA prep spin kolonce (dle návodu výrobce). Z kolonky linearizovanou DNA uvolníme 45 µl EB pufru (ber RNáz). Na agarózový gel nanese

vzorky o předpokládaném shodném množství DNA před štěpením, po štěpení a po přečištění. Hodnotíme zda je plazmid beze zbytku štěpen a zda nemáme velké ztráty po přečištění.

Pro přípravu próby pro část RFamidu a selenoproteinu O se jednalo o plazmid pBluescript II KS+ a linearizaci enzymem Not I a XhoI, respektive. Pro část MITF v plazmidu pCR4Blunt-TOPO byl k linearizaci použit Not I. Próba byla syntetizována z T3 promotoru pro RFamid, T7 pro selenoprotein O a T3 pro MITF.

### 6.3.12.2 Syntéza próby pro RNA *in situ* hybridizaci

Materiál: přečištěný štěpený plazmid v EB pufru (po přípravě dle předchozího protokolu (0,4 µg/µl); T3, T7 nebo SP6 RNA polymeráza (20U/µl); 10x transkripční pufr; RNasin HRP; DIG RNA labeling mix (značení: 3,5 mM DIG-11-UTP tj. asi každý 25 nukleotid); DNáza I (10U/µl), dH<sub>2</sub>O bez RNáz (např. DEPC voda); 4M LiCl; EB pufr

Přístrojové vybavení: inkubátor TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha); stolní mikrocentrifuga Eppendorf MicroSpin plus; elektroforéza Amersham BioScience HE33 se zdrojem

Postup: Připravíme standardní reakční směs: 1,5 µl plazmid, 0,6 µl RNA polymeráza, 1 µl transkripční pufr, 0,3 µl RNasin HRP, 1µl DIG, 5,7 µl DEPC dH<sub>2</sub>O a inkubujeme 2 hod při 37°C. Po této době přidáme 1 µl DNáza I a inkubujeme dalších 15 min při 37°C. Následuje přečištění: Přidáme 1,5 µl 4M LiCl a 38 µl 95% EtOH vychlazeného na -20°C, zamícháme a ponecháme 30 min při -80°C či přes noc při -20°C. Takto přesráženou RNA centrifugujeme zabalenou do parafilmu (ochrana RNA) 15 min 13000 rpm při 4°C. Pelet omyjeme 100 µl 74% EtOH vychlazeného na -20°C a opět centrifugujeme 13000 rpm 5 minut při 4°C. Odsajeme EtOH a pelet ihned rozpustíme v 50 µl EB pufru, alikvotujeme po 10 µl a skladujeme při -80°C; nejdéle 1 rok. Jako kontrolu úspěšnosti syntézy a ztrát po přesrážení nanášíme na 1% agarózový gel 1 µl nečištěné a 5 µl přečištěné próby a separujeme 15 min při 100 V.

### 6.3.12.3 RNA *in situ* hybridizace na mrazových řezech

Materiál: 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; methanol; 25% glutaraldehyd; 10% SDS; DEPC dH<sub>2</sub>O; 1M Tris-Cl pH 7,5, 5M NaCl; 1 M Levamisol – inhibitor endogenních fosfatáz; NBT-BCIP; RNáza A (10 mg/ml); ovčí sérum; anti DIG protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (AP)

Roztoky: PBT; 4% PFA v PBS; odmyvací roztok: 1x SSC, 50% formamid, 0,1% Tween 20, DEPC ddH<sub>2</sub>O; 20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>citrát . 2H<sub>2</sub>O, pH 4,5 (upraveno HCl); 100x Denhardt's: 2% BSA, 2% Ficoll, 2% PVP (1% polyvinylpyrrolidon); 10x sůl: 2M NaCl, 100mM Tris-Cl/Tris Base (12:1), 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50mM EDTA; kvasinková tRNA (10mg/ml); 50% dextran sulfát; hybridizační pufr: 1x sůl, 50% formamid, 10% dextran sulfát,

kvasinková tRNA (1mg/ml), 1x Denhardt's, DEPC dH<sub>2</sub>O; MABT: 100mM kyselina maleinová pH 7,5 (Sigma), 150mM NaCl, 0,1% Tween 20, dH<sub>2</sub>O; fosfatázový pufr: 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris pH 9,5, 0,1% Tween 20, dH<sub>2</sub>O; 1mM EDTA v PBT

Přístrojové vybavení: hybridizační inkubátor Robbins Scientific model 1000; stolní mikrocetrifuga Eppendorf MicroSpin plus

Postup: Provedení metody je rozvrženo na tři dny. Během prvního dne a až do prvního post-hybridizačního oplachu je potřeba pracovat s roztoky a v prostředí bez RNáz. Próba by měla být optimálně délky max. 600 nukleotidů.

Den 1: Mrazové řezy o síle 15 – 20 μm necháme roztát a zaschnout 30 min při pokojové teplotě. Vzorky refixujeme 20 min 4% PFA a následně opláchneme 2x PBS (3 min). Na ledu necháme rozmrazit ribopróbu (10 μl alikvót po syntéze, tj. asi 1 μg) a stočíme ji na dno mikrozkuhavky (20 s). Ve vodní lázni zahřejeme próbu na 70°C 5 min, stočíme na dno (20 s) a necháme na ledu 5 min. Ribopróbu ředíme v hybridizačním pufru tak, že výsledná koncentrace próby je 0,1 – 1 μg/ml. 200 - 250 μl ředěné próby aplikujeme na sklo se vzorky a kryjeme krycím sklem. Hybridizujeme přes noc v 55 - 68°C ve vlhké komůrce. Teplotu hybridizace optimalizujeme pro každou próbu, začínáme s teplotou 68°C.

Den 2: Předehřejeme 150 ml odmývacího roztoku (50 ml použijeme na 1 oplach až čtyř skel v plastové krabičce 6x12 cm). Inkubujeme řezy s odmývacím roztokem 15 min při 68°C – uvolnění krycích skel. Opatrně sejmeme krycí skla a 2x oplachujeme odmývacím roztokem 30 min 68°C. Dále dvakrát oplachujeme (opět vždy po 50 ml až čtyři skla) při pokojové teplotě MABT puftrem. Nespecifickou vazbu anti DIG protilátky blokuje inkubací skel v 20% tepelně inaktivovaném séru v MABT 1,5 hod při pokojové teplotě (500 μl/sklo, bez krycího skla). Anti DIG protilátku ředíme v 20% séru v MABT 1:1000, odstraníme blokovací roztok a řezy inkubujeme s roztokem protilátky ve vlhké komůrce přes noc při pokojové teplotě (500 μl/sklo).

Den 3: Odstraníme roztok s protilátkou a oplachujeme 5x 20 min v MABT (opět po 50ml až čtyři skla). Skla inkubujeme 2 x 10 min s fosfatázovým puftrem (50 ml). Řezy umístíme zpět do vlhké komůrky, odstraníme fosfatázový pufr a na každé sklo nanese 500μl fosfatázového pufru s NBT/BCIP (10 μl NBT/BCIP + 490 μl fosfatázového pufru). Inkubujeme ve tmě při pokojové teplotě. Kontrolujeme ve světelném mikroskopu po 30 min (zpravidla barvení silně pozitivní kontroly), po několika hodinách a případně necháme inkubovat přes noc při 4°C. Výsledkem je při tomto uspořádání mírně difundující fialové zbarvení (produkt reakce), lokalizací odpovídající lokalizaci mRNA studovaného genu. Reakci zastavíme několika oplachy (každý 5 min) 1mMEDTA v PBT. Uchovááme v 4% PFA v PBS při 4°C.

### 6.3.13 RNA *in situ* hybridizace na blocích tkáně či celých jedincích

Materiál: 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; methanol; Proteináza K (50U/ml); 25% glutaraldehyd; 10% SDS; DEPC dH<sub>2</sub>O; 1M Tris – Cl pH 7,5, 5M NaCl; levamisol – inhibitor endogenních fosfatáz; NBT BCIP; RNáza A (10 mg/ml); ovčí sérum; anti – DIG AP konjugovaná protilátka

Roztoky: PBT; 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v MeOH; glycin v PBT (2 mg/ml); 4% PFA v PBT; prehybridizační pufr: 50% formamid, 5x SSC pH 4,5, DEPC dH<sub>2</sub>O, 5mM 0,5M EDTA, 0,1% Tween 20, heparin (50 µg/ml); 20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>citrát . 2H<sub>2</sub>O, pH 4,5 (upraveno HCl); hybridizační pufr: 50% formamid, 5x SSC, DEPC ddH<sub>2</sub>O, 0,1% Tween 20, 5mM EDTA, heparin (50 µg/ml), tRNA (50 µg/ml), lososí sperma (50 µg/ml); roztok I: formamide 50%, 4x SSC, 1% SDS; RNase free dH<sub>2</sub>O; roztok II: 0,5 M NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 7,5, dH<sub>2</sub>O; roztok III: 50% formamid, 2x SSC pH 4,5, DEPC dH<sub>2</sub>O; TBST: 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-Cl pH 7,5, 0,1 % Tween 20, dH<sub>2</sub>O, 2 mM levamisol; NTMT pufr: 100 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub> 0,1 % Tween 20, dH<sub>2</sub>O; barvicí roztok: 10 µl NBT BCIP/0,5 ml NTMT pufru; 1 mM EDTA v PBT

Přístrojové vybavení: hybridizační inkubátor Robbins Scientific medel 1000

Postup: Původní protokol byl připraven pro barvení myších embryí, s menšími úpravami (zejména hybridizační teploty a časů jednotlivých inkubací) lze s úspěchem aplikovat i na celé juvenilní či dospělé medúzy, popřípadě vypreparovaná rhopalia. Metoda trvá čtyři dny, přičemž první den a až do prvního post-hybridizačního oplachu je potřeba pracovat s roztoky a v prostředí bez RNáz. Pokud není uvedeno jinak, oplachem se rozumí 5 min v daném roztoku při pokojové teplotě. Pro jednu až tři dospělé medúzy pracujeme s 5 ml promývacích roztoků. Před procedurou medúzy rozstříháme na ekvivalentní poloviny a zvon v mnoha místech propíchneme sterilní jehlou. Snížíme tak nespecifické zachytávání prób.

Den 1: Fixované tkáně (obvykle stabilně v 4% PFA v PBS či ASW) promyjeme od fixativa 2x v PBT. Bělíme v 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v MeOH 20 minut a 3x opláchneme PBT. Permeabilizujeme 10 min roztokem proteinázy K v PBT (1 µl proteináza K/1 ml PBT). Reakci zastavíme dvěma oplachy glycinu v PBT (2 mg/ml), posléze ještě opláchneme 2x PBT. Tkáně refixujeme roztokem 0,2% glutaraldehydu a 4% PFA v PBS po dobu 20 minut. Fixativum odmyjeme 2x oplachy PBT. Vzorky prehybridizujeme 60 – 90 min s 2 ml hybridizačního pufru na vzorek při 70°C. Ribopróby (10 µl alikvóty po syntéze – cca 1 µg próby) denaturujeme ve 100 µl hybridizačního pufru 10 minut při 75 – 80°C. Ode vzorků v prehybridizačním pufru odebereme 1 ml roztoku a nahradíme jej 0,9 ml předehřátého hybridizačního pufru a denaturovanou ribopróbou. Roztoky v průběhu manipulací nenecháme zchladnout. Inkubujeme přes noc při 70°C (pro celé medúzy zpravidla při 60°C či dokonce 55°C) v bezpečně uzavřených 2 ml eppendorf mikroskopických.

Den 2: Oplachujeme 2x 30 min v předehřátém 70°C roztoku I a 1x oplachujeme při 70°C v předehřátém roztoku I/II (1:1) 10 min. 3x oplachujeme v roztoku II. Volnou a nespecificky vázanou próbu odstraníme dvěma inkubacemi v roztoku RNáza A v roztoku II (100 µg/ml) při 37°C. Inkubujeme 2x 30 minut s roztokem III při 65°C a 3x opláchneme TBST. Nespecifickou vazbu protilátek detekujících DIG značené nukleotidy blokuje inkubací v 10% ovčím sérum v TBST 2 hod. Protilátku ředíme 1:1000 v TBST bez levamisolu a inkubujeme přes noc v 4°C.

Den 3: 6x oplachujeme 1 hodinu TBST, po posledním oplachu inkubujeme v TBST přes noc.

Den 4: Vzorky ekvilibrujeme 2x 20 minut v NTMT pufru. Barvíme v minimálním objemu 0,5 ml barvicího roztoku 30 min až přes noc (průběh barvení kontrolujeme pod mikroskopem). Reakci zastavíme několika oplachy 1 mM EDTA v PBT. Vzorky uchovááme v 4% PFA v PBS při 4°C.

### **6.3.14 Charakterizace buněčné lokalizace proteinu translační fúzí s GFP**

Chceme-li zjistit subbuněčnou lokalizaci studovaného proteinu, jednou z cest je příprava expresního plazmidu, ve kterém je náš studovaný gen fúzován s GFP kazetou. Po transfekci do buněk tak v místech jeho produkce pozorujeme také GFP. Pro studium lokalizace J2 krystalinu v rámci buňky tak byla připravena fúze J2 krystalinu (kompletního ORF) s EGFP či DsRed v plazmidech pDsRed2 – C1, pEGFP-N3 a pEGFP-C1. Využity byly metody popsané výše. Postup: amplifikace J2 ORF z plazmidu pomocí PCR; štěpení, defosforylace a přečištění PCR produktu; štěpení a izolace plazmidu; ligace inzertu s plazmidem a amplifikace výsledného konstruktů; transfekce konstruktů do buněk. Následující metody využijeme po přípravě konstruktů.

#### **6.3.14.1 Příprava COS7 buněk na skla ve 24 jamkových destičkách**

Materiál: 24 jamkové destičky (Nunc); poly-L-lysin; voda pro práci s tkáňovými kulturami; skla o průměru 11 mm; COS7 buňky; kompletní Dulbecco's Modified Eagle's Medium sérum

Postup: Po celou dobu pracujeme sterilně v laminárním boxu. Skla vložíme na dno jednotlivých jamek destičky a přidáme poly-L-lysin (20 µg/ml). Skla ponoříme a inkubujeme při UV 1,5 - 2 hod. Odsajeme poly-L-lysin a 3x opláchneme 1 ml tkáňové vody. Skla necháme dokonale uschnout (>30 min). Přidáme pasážované buňky ředěné kompletním médiem, tak aby druhý den dosáhly 25% konfluence.



### 6.3.14.2 FUGENE transfekce buněk na sklech v 24 jamkových destičkách

Materiál: plazmid (připravený maxipreparací viz. dále); FUGENE 6 Transfection Reagent; 24 jamkové destičky s připravenými skly porostlými buňkami o 25% konfluenci; Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Přístrojové vybavení: CO<sub>2</sub> inkubátor Thermo Forma

Postup: Na dno plastové mikrozkušavky pipetujeme 300 ng plazmidu. V laminárním boxu pipetujeme do druhé eppendorf mikrozkušavky 50 µl média bez séra (FCS), ponecháme 5 minut teplot a přidáme 1 µl FUGENE (kapacita až 1 µg). Obsah promícháme a pipetujeme na kapku plazmidu, opět promícháme (1x protáhneme žlutou špičkou). Inkubujeme 15 - 45 min. Takto připravený plazmid formovaný do umělých micel pipetujeme po kapkách na různá místa hladiny jamky, kde máme připravené buňky přibližně 25% konfluencí. Buňky umístíme zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Případnou expresi (např. GFP) hodnotíme po 24 – 48 hod.

### 6.3.15 Histologická barvení

V průběhu let, kdy byla biologie odkázána zejména na světelnou mikroskopii, byla vyvinuta řada barvicích technik schopných zviditelnit a odlišit specifické tkáně či jejich komponenty. Tyto metody jsou zpravidla založeny na afinitě barviva k tkáni, buněčnému typu či organele, dle jejich izoelektrického bodu a případně dalších vlastností. Lze tak jednoduchými barvicími technikami poměrně spolehlivě prokázat přítomnost proteinů i jejich specifických podskupin s určitými vlastnostmi (např. kolagenu či keratinu), které byly předmětem studia, coby potenciální materiál čočky. Barvení byla aplikována na mrazové řezy rhopalii.

Materiál: Ponceau S roztok 10x; amidočern 10B; oranž G; jasná zelená (Light green yellowish); kyselina fosfowolframová (PTA); kyselina octová; azokarmín; anilínová modř; anilínový olej

Roztoky: 1% kyselina octová; 1% kyselina fosfowolframová (PTA); PBS; glycerol; 4% PFA v PBS; barvicí roztok Oranž G a jasně zelené: 2% Oranž G, 0,2% jasná zelená, 1% kyselina fosfowolframová (PTA), 1% kyselina octová (přidat po rozpuštění barviv); anilínový EtOH: 0,1% anilínový olej v 96% EtOH; 0,01% azokarmín G; kyselý EtOH: 1% kyselina octová v 96% EtOH; 5% PTA; roztok anilínové modře a oranž G: 0,5% anilínová modř, 2% oranž G, 1% PTA, 8% kyselina octová - přefiltrujeme a před použitím ředíme 1:1 s dH<sub>2</sub>O

Přístrojové vybavení: mikroskop Nikon Diaphot 300 s barevnou kamerou Pixelink

Software: Lucia Image software; Adobe Photoshop CS; Adobe Illustrator CS

Postup:

**Ponceau S (proteiny)**

Mrazové řezy rhopalii opláchneme třikrát PBS a refixujeme 10 minut 4% PFA v PBS, následně opláchneme vodou. Na řezy nakapeme 1x Ponceau S roztok a inkubujeme po různé časové intervaly (5 s - 10 min). Krátce ponoříme do vody a rychle pozorujeme v mikroskopu, případně před vyschnutím montujeme do glycerolu.

#### **Amidočerně (proteiny)**

Připravíme 1% roztok amidočerni 10B v ethanolu a roztok filtrujeme. Mrazové řezy rhopalii opláchneme třikrát PBS a refixujeme 10 min 4% PFA v PBS, následně opláchneme vodou. Řezy dehydratujeme ethanolovou řadou (25% - 50% - 75% - 100% po pěti minutách). Na řezy nakapeme roztok amidočerni a inkubujeme po různé časy. Řezy diferencujeme v ethanolu a vizuálně kontrolujeme pod mikroskopem. Preparáty montujeme do glycerolu.

#### **Oranž G a jasná zelená (Light green yellowish) (kolagen, keratin)**

Hydratované řezy rhopalii na sklech (3x PBS; 10 min 4% PFA v PBS; H<sub>2</sub>O oplach) umístíme do barvicího roztoku na 5 minut. Poté řezy opláchneme několikrát v destilované vodě a montujeme do glycerolu.

**Oranž G** barvení provedeme podobně s tím, že do barvicího roztoku nepřidáme jasnou zelenou. Můžeme dobarvit hematoxylinem (40 s).

**Azan – Mallory barvení (kolagen)** barvení vyvinuté původně pro pojivové tkáně. Hydratované řezy rhopalii barvíme 10 – 40 min v 0,01% azokarmínu G při 58°C. Řezy krátce opláchneme v dH<sub>2</sub>O a diferencujeme v anilínovém EtOH. Diferenciaci zastavíme v kyselém EtOH a následně řezy moříme 10 min v 5% PTA. Řezy krátce opláchneme v dH<sub>2</sub>O a barvíme 20 min v roztoku anilínové modré a oranže G. Opláchneme od přebytku barviva a diferencujeme v kyselém EtOH. U savčích tkání jsou výsledkem červená jádra, oranžovočervené erythrocyty, modré až fialové kolagenní vazivo, červená svalovina a modrý amyloid.

### **6.3.16 XRD study**

Rentgenová difrakce byla využita pro průkaz případné anorganické složky čoček a stanovení složení statolitů *T. c.* Všechna měření byla provedena na Ústavu geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů UK v Praze Davidem Goliášem, PhD.

Materiál: vypreparované čočky a statolity; skleněná vlákna, vazelína pro lepení objektů na vlákna

Přístrojové vybavení: Debye – Schere filmová kamera 114,6 mm

Software: HighScore (PANalytical)

Postup: Jak čočky, tak statolity byly pod stereolupou nalepeny na šipčku skleněného vlákna. Vzorky byly analyzovány metodou práškové rentgenové difrakce na Debye - Scherer filmové kameře s průměrem 114.6 mm diameter, CuK zářením s 22 a 44 hod expozicí. Získaná data byla zpracována HighScore (PANalytical) software za využití ICCD databáze difrakčních vzorů.

## 7. Výsledky

Následuje přehled výsledků analýz gradientu refrakčního indexu v čočkách *Tripedalia cystophora*, charakteru nového J2 krystalinu a exprese MITF, RFamidu a selenoproteinu O v rámci *Tripedalia cystophora*, které budou dále diskutovány v následující kapitole.

### 7.1 Krystalická fáze v centru čoček: rentgenová difrakce

Dospělé medúzy byly nasbírány v průběhu léta 2005 a z těchto jedinců (samic s larvami těsně před uvolněním) byly úspěšně založeny kultury polypů. Kultury se podařilo udržet a spontánně metamorfující polypi (v medúzové stadium) byli odebíráni v různých stádiích metamorfózy a fixováni pro studium vývoje rhopalií, čoček velkých očí zejména. Stejně taky byly vypreparována a fixována rhopalia z dospělých jedinců.

Studium morfologie očí na mrazových řezech odhalilo u čoček obou velkých očí odlišnou strukturu vnitřní a vnější části. Materiál vnitřní části čočky vykazoval krystalický charakter připomínající statolit, krystalickou konkreci o neznámém složení v dolní části rhopalia. Anorganický materiál či vysoká koncentrace proteinů v čočce jsou dva vhodné materiály pro zvýšení indexu lomu čočky a tedy množství světla, které se láme a dopadá na sítnici. Proto bylo složení statolitu i čočky velkého oka, kde byl krystalický vnitřek zjevnější než v čočce malého oka, analyzováno rentgenovou difrakcí a výsledný difrakční vzor byl porovnán s databází a vyhodnocen.

Difrakční vzor statolitů jednoznačně určil přítomnost jediné hrubozrnné fáze s hlavními difrakčními pruhy (rozlišení v Å, intenzita 0-10): 60,3 (8), 3,49 (6), 2,816 (9) a 1,853 (7), což odpovídá velmi dobře kartě 36 – 617 ICDD databáze, která představuje bassanit (monoklinický hemihydrát síranu vápenatého). Toto je v souladu s předchozími biomineralogickými studiemi statolitů jiných žahavců BECKER *et al.* (2005). Naproti tomu u čoček se objevily pouze slabé difrakce odpovídající halitu (chlorid sodný) z vykrystalizovaných zbytků fyziologického roztoku a to jen při dvojnásobení expoziční doby (44 hod).

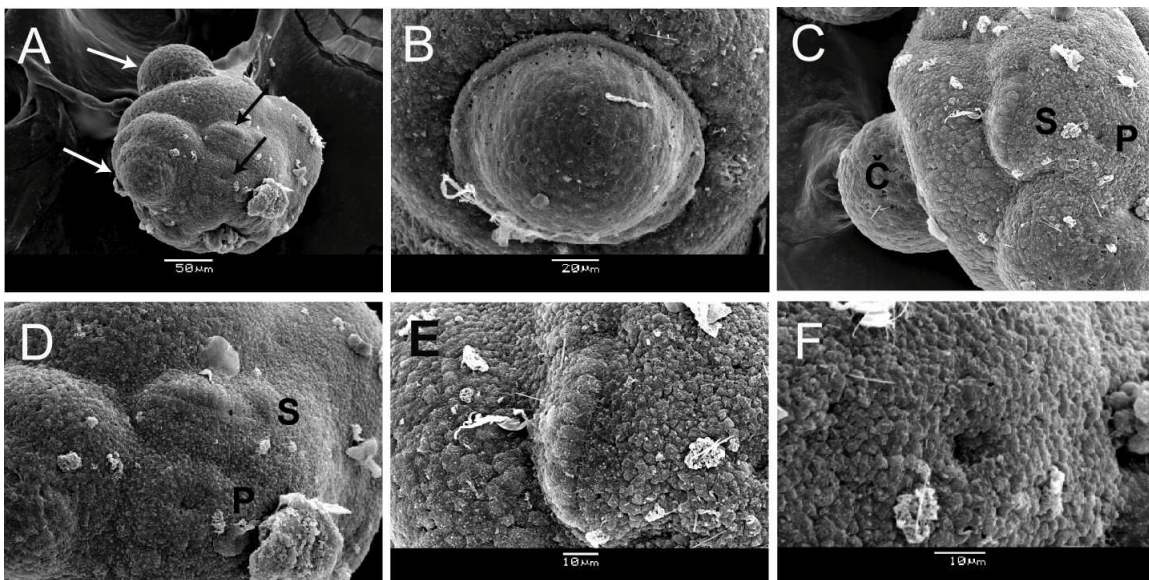
Přítomnost anorganické krystalické fáze v čočkách *Tripedalia cystophora* tedy nebyla prokázána a s vysokou pravděpodobností ji můžeme vyloučit. V dalších experimentech jsme se tedy zaměřili na proteiny. V rámci této studie však bylo objasněno do té doby neznámé složení statolitu, který je tedy tvořen z hemihydrát síranu vápenatého. Všechna měření byla provedena Davidem Goliášem, PhD. na ÚGMNZ PšF UK.

## 7.2 Elektronmikroskopická analýza

### 7.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie rhopalií

Protože v minulosti ještě nebyly tyto unikátní zrakové komplexy takto charakterizovány, rozhodli jsme se pro SEM dospělých rhopalií a detailnější popis externí morfologie. Cílem bylo mimo jiné zjistit, zda je v pitu a slitu struktura podobná čočce (což bylo v případě slitu pozorováno na mrazových řezech) a ověřit tak případně její přítomnost.

I když rhopalia nebyla optimálně fixována, výsledky ze SEM byly poměrně uspokojivé a bylo možné pozorovat detailní morfologii menších očí, jak pitu, tak slitu. Na laterálních pohledech byla jasně patrná vystupující struktura v otevření retiny slitu, čočka. SEM fotografie rhopalia z různých pohledů shrnuje Obr. 6.



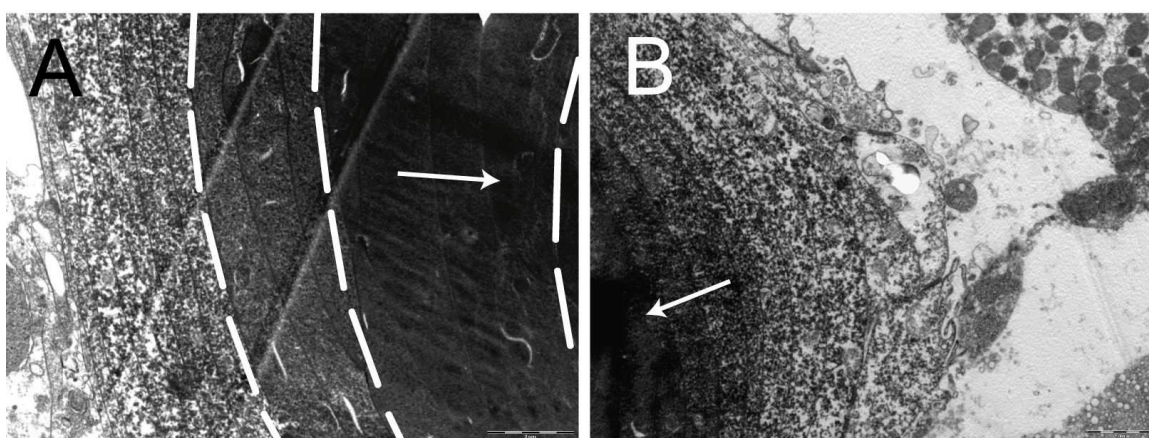
**Obr. 6: SEM mikrofotografie rhopalia a jednotlivých očí.** (A) Celkový pohled na rhopalium mírně z boku. Bílé šipky mří na momentálně horní velké oko s čočkou a dolní menší oko s čočkou. Černé šipky ukazují pozici slitu (nahore) a pitu (dole). (B) Detail čočky velkého oka. (C) Pohled na rhopalium z boku. Č – čočka velkého oka, S – slit (vlevo od písmene), P – pit (vlevo od písmene). (D) Detail menších očí slitu a pitu. Vlevo část malého oka s čočkou. (E) Detail zjevně asymetrického slitu. Buňky čočky vystupují jako oválné struktury do popředí. (F) Detail pitu, nejjednoduššího oka rhopalia. Bílé předměty na povrchu rhopalia jsou znečištění, tedy artefakt.

### 7.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie

#### 7.2.2.1 TEM: gradient v čočce

Struktura čočky byla analyzována na transmisním elektronovém mikroskopu. Rhopalia byla zalita do pryskyřice a řezy vedeny v úrovni obou čoček, tak aby byly získány jejich průřezy.

Řezy různými částmi čočky, jak velkého, tak malého oka, odhalily téměř koncentrické vrstvy buněk se stoupající elektronovou denzitou směrem k centru čočky. Počet ribozomů také rostl v tomto směru a vysoká elektronová hustota v centru čočky tak naznačovala přítomnost vysoké koncentrace proteinů (Obr. 7). U buněk z periferních částí čočky byly z organel pozorovatelné především zmíněné zmnožené ribozómy a jádra, směrem do centra čočky stoupala elektronová hustota (a tedy tmavé zbarvení pozorovaného preparátu) tak, že organely pozorovatelné nebyly a buňky se jevily kompletně vyplněné elektrondenzní hmotou, pravděpodobně tedy proteinem. Pokud bychom již v minulosti měřený refrakční index těchto míst čočky (1,48) přepočítali na koncentraci proteinů, jednalo by se v centru čočky o 75% protein (přepočet dle SWEENEY *et al.* (2007)). Strukturu čoček zpracovanou na TEM shrnuje Obr. 7.



**Obr. 7: TEM řezů čočkami velkého a malého oka.** (A) Řez částí čočky velkého oka, šipka ukazuje do centra čočky, maxima elektronové hustoty. Dobře jsou patrné jednotlivé vrstvy buněk. Přerušované čáry vyznačují pásy v čočce se zjevně odlišnou elektronovou hustotou stoupající do centra čočky. (B) Řez částí čočky malého oka, šipka opět ukazuje do centra čočky. Stupnice vpravo dole vždy odpovídá 2  $\mu\text{m}$ .

#### 7.2.2.2 TEM: vznik gradientu elektronové hustoty ve vývoji čočky

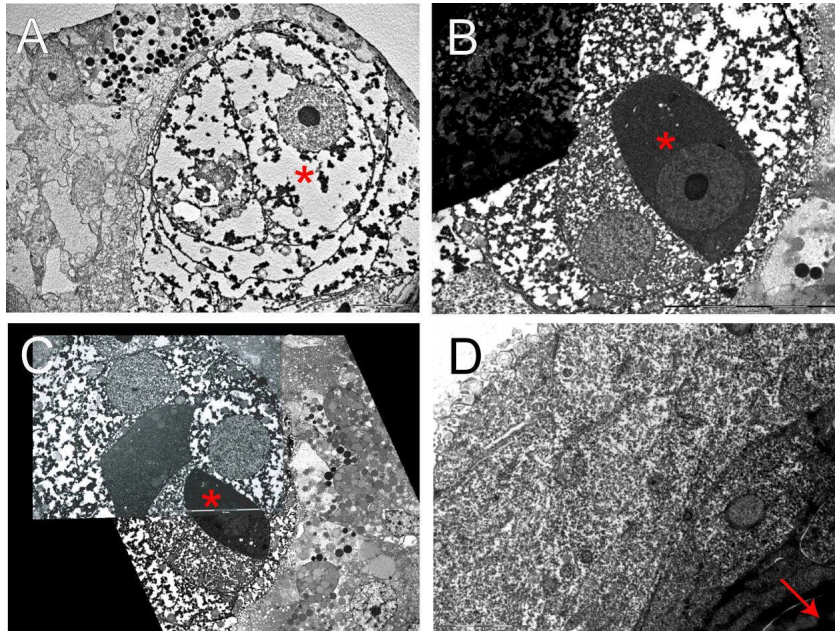
Byly připraveny řezy pro TEM juvenilními medúzami různého stáří tak, aby mezi jedinci byly minimální vývojové rozestupy. Na řezech z různých jedinců tak bylo možné pozorovat vývoj čočky a průběh koncentrace elektrondenzní hmoty do centra čočky.

Porovnání různých stádií objasnilo vznik elektrondenzního centra. Na fotografiích je demonstrováno, že gradient elektronové hustoty je v čočce formován následkem rozdílného plnění buněk elektrondenzní hmotou (tedy proteiny, viz stoupající hustota ribozómů, výsledky histologie dále, IHC a vyvrácení přítomnosti anorganické složky) a tedy rozdílem syntézy proteinů v jednotlivých buněčných vrstvách (Obr. 8). Obdobný mechanismus byl navržen na základě morfologické studie LASKA - MEHNERT (1985).

Bylo pozorováno, že z buněk po dělení vždy jedna postupuje více směrem k centru čočky a druhá zůstává spíše u periferie (ale zůstává poblíž sesterské buňky). Buňky, které se staly



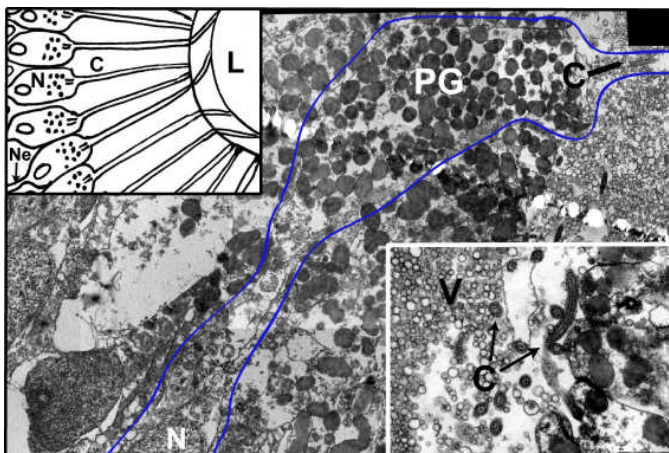
centrálnějšími začaly produkovat větší množství elektrondenzní hmoty a po čase ztratily funkční jádro (pozorování rozpadu jaderné membrány). Čím více k centru, tím větší produkce. Vývoj čočky z tohoto hlediska dokumentuje Obr. 8.



**Obr. 8: Vývoj čočky malého oka.** A – D zobrazuje různá stádia vývoje čočky, která vzniká „vrolováním“ buněk do centra. Stáčení lze nejlépe tušit na fotografii C. Jedna z buněk je označena hvězdičkou a můžeme sledovat její plnění elektrondenzní hmotou s předcházející vysokou koncentrací ribozómů (A). Buňky nejvíce vyplněné se dostávají do centra, tak jak naznačuje červená šipka (D).

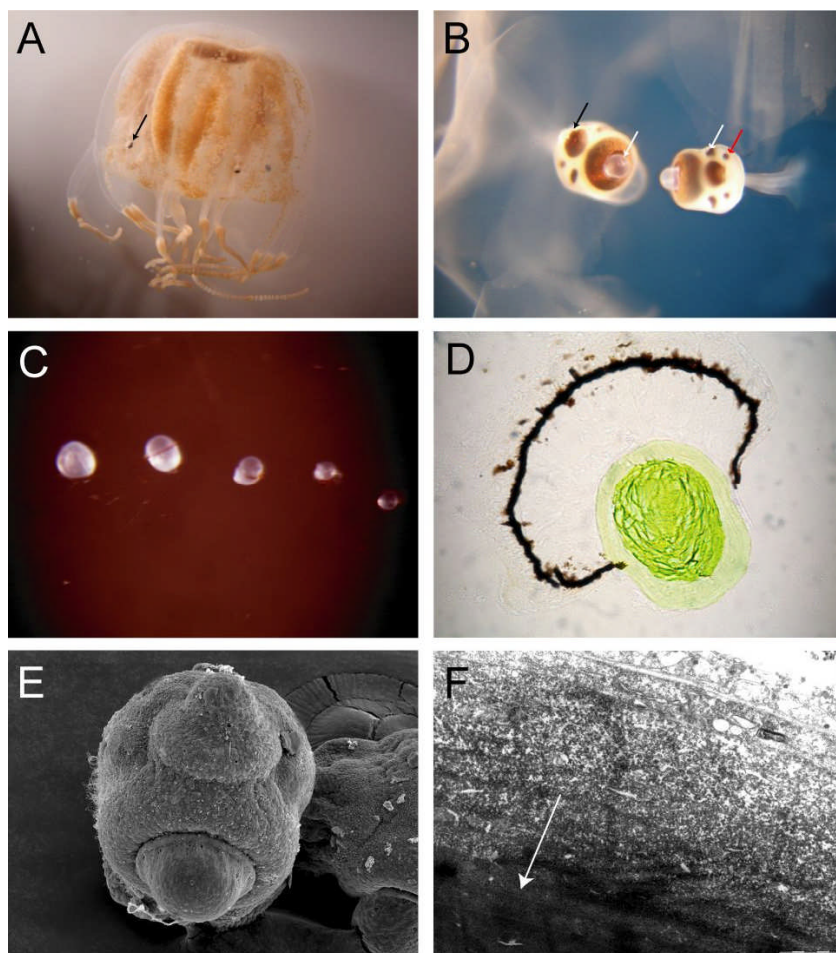
### 7.2.2.3 TEM: charakterizace pigmentovaného fotoreceptoru

Protože v literatuře se názory na stavbu této buňky různí a naše laboratoř se intenzivně zabývá opsiny a jinými proteiny těchto buněk, byla v rámci morfologické charakterizace očí *T. c.* připravena i ultrastruktura fotoreceptorů z retiny velkého oka s čočkou (Obr. 9). Z pozorování jsme rekonstruovali charakter retiny, tak jak je zakreslen v horním levém výseku Obr. 9.



**Obr. 9: Pigmentovaný fotoreceptor.** Schéma znázorňuje předpokládanou stavbu retiny velkého oka. Dolní výseč zobrazuje detail apikální části fotoreceptoru s ciliemi. L - čočka, C - cilium fotoreceptoru, N - jádro, Ne - neurit, PG - pigmentové granule, V - mikrokly. Obrys jedné fotoreceptorové buňky je znázorněn modrou čarou.

Celkový přehled morfologie shrnuje Obr. 10.

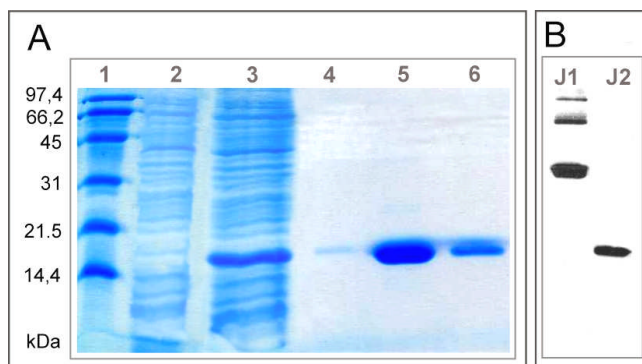


**Obr. 10: Morfologie očí a čoček zejména.** (A) Pohled na samičí medúzu plnou larev, šipka ukazuje na jedno z rhopalií. (B) Vypreparovaná rhopalia, barevné šipky ukazují na jednotlivé typy očí (černá na malé oko s čočkou, bílá vlevo na velké oko s čočkou, bílá vpravo slit a červená pit). (C) Vypreparované čočky v kvalitě v jaké byly použity i na proteinovou charakterizaci (velikost cca 150  $\mu\text{m}$  – 75  $\mu\text{m}$ ). (D) Řez velkým okem s čočkou s patrnou krystalickou fází v centru čočky (zeleně kolorováno). Tmavou linií tvoří melanin v zadní části retiny. (E) Frontální pohled na rhopalium (SEM). Nahoře malé oko s čočkou a dole velké oko s čočkou. (F) TEM řezu čočkou velkého oka. Zobrazena vnější část čočky. Bílá šipka značí gradient elektronové hustoty směrem do středu čočky.

### 7.3 Příprava protilátek proti J1 a J2 krystalinům

Protilátky byly připraveny jako polyklonální přímou imunizací králíka krystaliny, jak je popsáno výše. Specifita protilátek byla ověřena na Western blotu rhopalií a IHC na mrazových řezech.

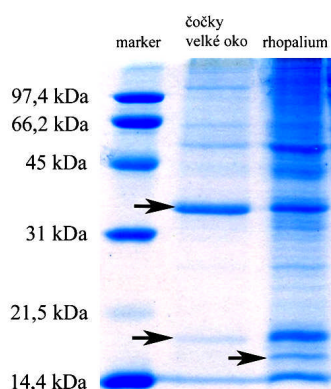
J2 protilátka je maximálně specifická a nebylo potřeba jakékoli další purifikace protilátky ze séra či úpravy protokolu pro IHC. J1 protilátka detekovala velmi pěkně na membráně J1 krystalin, ale po delší expozici i další dva proteiny o větších velikostech. Pro J1 protilátku byl pro IHC používán protokol zvyšující specifitu barvení.



**Obr. 11: Příprava proteinu pro imunizaci a kontrola specifity protilátek.** (A) SDS PAGE z přípravy rekombinantního J2 krystalinu (1) marker, (2) lyzát z buněk před indukcí a (3) po indukci. (4) První eluce, kde se protein zpravidla ještě neuvolňuje, (5) druhá eluce s maximem proteinu a (6) třetí eluce. Naneseno 7.5  $\mu$ l z eluce, každý pruh markeru 1  $\mu$ g proteinu. (B) Připravené protilátky proti J1 a J2 krystalinu, testované na homogenizátech z 2 rhopalií v každé z drah. J1 expozice 4 min, J2 expozice 1 min. Čísla po levé straně udávají molekulovou hmotnost (v kDa) dle markeru.

## 7.4 Proteinová charakterizace čoček

Čočky z velkého oka byly izolovány, homogenizovány a rozděleny na SDS PAGE. Výsledky potvrdily závěry předchozí studie PIATIGORSKY *et al.* (1989) v tom smyslu, že J1 je hlavním proteinem čočky. Na rozdíl od této studie jsme však v homogenizátu z 25 čoček nepozorovali pruh odpovídající J3 krystalinu a to ani po barvení vysoce citlivým SimplyBlue SafeStain (detekce až 7 ng proteinu v pruhu; testováno na BSA). To odpovídá výsledkům z čoček *Carybdea marsupialis*, příbuzné čtyřhranky a naznačuje možnou kontaminaci izolací původní studie jinými částmi rhopalia, kde je J3 přítomen ve větším množství. Na gelu z našich homogenizátů jsme pozorovali hlavní J1 pruh, pruh odpovídající J2 krystalinu a několik dalších o větších velikostech (Obr. 12).



**Obr. 12: Proteinová charakterizace čoček a celých rhopalií.** Na SDS PAGE bylo separováno 25 vypreparovaných čoček z velkého oka (druhá dráha) a několik rhopalií (třetí dráha). Tři šipky odpovídají jednotlivým krystalinům, J1 35 kDa, J2 19,5 kDa, J3 19 kDa.



## 7.5 Lokalizace J1 a J2 krystalinů připravenými protilátkami

Protilátky připravené proti J1 a J2 krystalinům byly použity pro vizualizaci lokalizace krystalinů v různých stádiích vývoje čočky. Vzorky byly zpracovány IHC metodou na mrazových řezech či celých jedincích. Barveny byly, jak mrazové řezy metamorfujícími polypi, tak juvenilními medúzami a rhopalii dospělých medúz. Na řezech měly být protilátky využity zejména pro analýzu gradientu refrakčního indexu a charakterizaci J2 krystalinu jako nového proteinu. S touto protilátkou byli inkubováni i celí jedinci v různých stádiích životního cyklu. Studována byla exprese obou krystalinů v pitu a slitu.

### 7.5.1 J1 krystalin

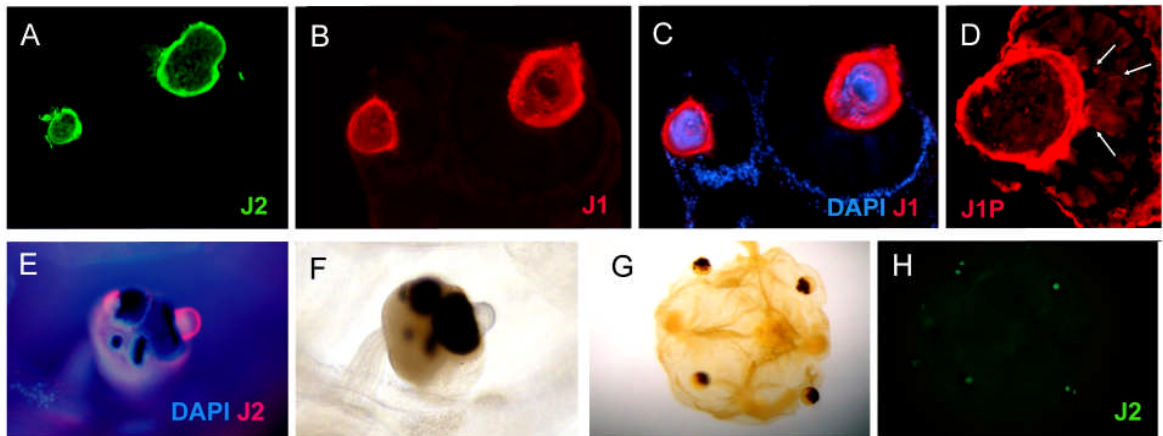
J1 krystalin jako nejhojnější krystalin je v rhopaliu dospělých medúz přítomen převážně v čočkách obou velkých očí. Barvení ukázala, že je přítomen na řezech čočkou v celé jejich ploše s mírným poklesem v centru, což je zdánlivě v rozporu s teorií rostoucí koncentrace proteinů ve směru do centra čočky. Lokalizaci J1 v tkáních dospělé medúzy, zejména rhopaliu shrnuje Obr. 13. Velmi zajímavá a níže komentovaná je i jeho exprese v menších očích, slitu a pitu, pozorovatelná až u dospělců (Obr. 17). Mimo přítomnosti v rhopaliu byl detekován J1 krystalin i v gartrovaskulární dutině rhopalia, stěně statocysty a nematocytech, jak dospělé medúzy, tak (a to převážně) u polypů a juvenilních medúz a to oběma J1 protilátkami.

### 7.5.2 J2 krystalin

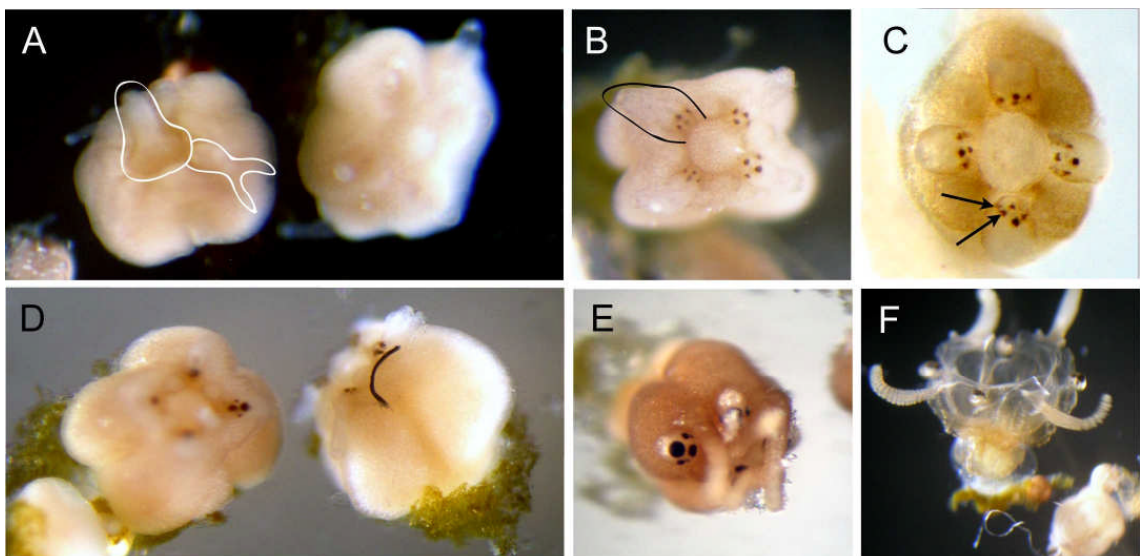
V porovnání s lokalizací J1 krystalinu není lokalizace J2 v čočce ani částečně homogenní a tento krystalin je produkován především periferní částí čočky. Tato skutečnost a nepřítomnost J2 v pitu a slitu bude diskutována. Přehled barvení protilátkou proti J1 a J2 krystalinu v čočkách velkých očí shrnuje Obr. 13.

J2 krystalin, protein s menším zastoupením v čočce než J1, nacházíme v dospělé medúze i mimo čočku. Nalézáme jej v dutině statolitu obdobně jako J1 krystalin.

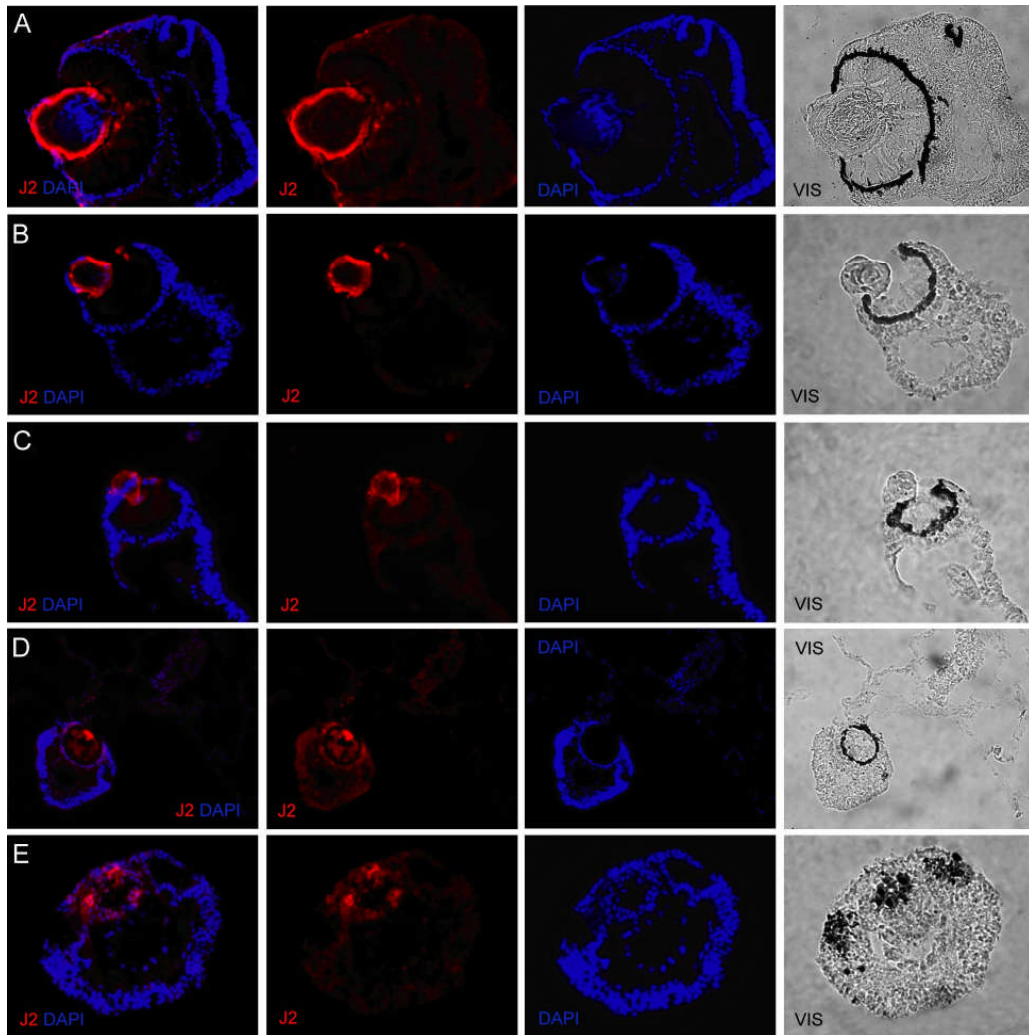
Pro studium syntézy J2 krystalinu v průběhu ontogeneze, zejména během vývoje čočky byla připravena série řezů metamorfujícími polypi, juvenilními medúzami a rhopalii o různém biologickém stáří. Řezy pokrývaly vývoj čočky velkého a případně malého oka od okamžiku, kdy se objevuje první pigment v komplexních očích. První exprese J2 krystalinu byla zaznamenána v oblasti budoucí čočky velkého oka, krátce po začátku pigmentace (Obr. 15 E). Později, když se čočka již vyčleňuje jako samostatný útvar je exprese velmi specifická, ale stále pouze v čočce velkého oka (Obr. 16). Shrnutí a zásadní porovnání Obr. 13.



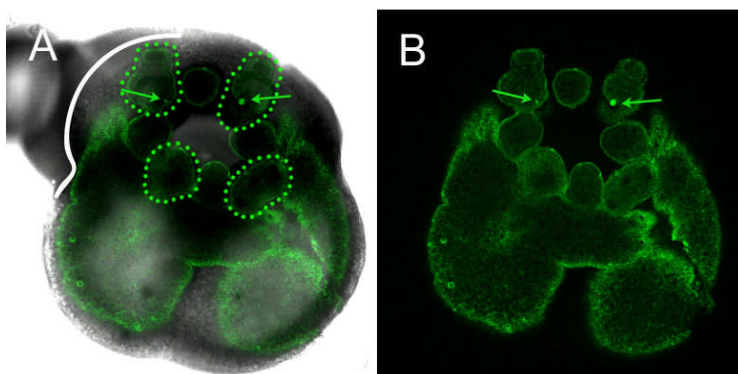
**Obr. 13: Lokalizace J1 a J2 krystalinu v čočkách velkých očí rhopalia.** (A) J2 krystalin nacházíme především ve vnější části čočky. (B) Odlišná lokalizace J1 krystalinu. J1 je exprimován v celé ploše čočky, pozorovaný nejsilnější signál na její periferii může být artefakt způsobený nedostupností centrálních částí čočky. (C) Jako B s překryvem s DAPI pro lepší orientaci v rámci rhopalia. (D) Vizualizace J1 krystalinu bez úpravy protokolu pro IHC a s vysokou koncentrací protilátky J1 – P, která zviditelňuje ciliární struktury za čočkou a naznačuje barvení fotoreceptorových buněk. (E) Lokalizace J2 krystalinu v rámci celého rhopalia. (F) Pohled na stejné rhopalium ve viditelném spektru. (G) Třídenní medúza s specifickou exprese J2 krystalinu v čočkách rhopalía (H).



**Obr. 14: Přehled stádií během metamorfózy polypa v medúzu.** Připraveno pro lepší orientaci a popis během experimentů. (A) raná fáze – (F) pozdní fáze. Pro všechna stádia je typická výrazná tetaradiální symetrie a tedy čtyři nápadné tělní laloky. (A) Počátek metamorfózy, jedno z raných stádií, pro které je typický vystouplý hypostom a rozeklané chapadlo u jehož báze se počíná formovat rhopalium (vyznačeno bílou linií). (B) Rozeklané chapadlo je resorbováno a zbývá z něj protáhlý celistvý kus (vyznačeno černou linkou); začala pigmentace jednotlivých očí. Prozatím pozorujeme pouze čtyři pigmentové skvrny. (C) Chapadlo je zcela staženo, dediferencováno a použito na výstavbu rhopalía. Na rhopalíu je již patrně všech šest základů očí, již rozlišíme pit a slit (šipky). (D) Střední stádium metamorfózy, kde ještě není výrazný krystalický statolit, ale oči jsou již poměrně dobře vyvinuté; formují se čočky. (E) Pozdní stádium metamorfózy s dobře vyvinutými rhopalii a krystalickými statolity umístěnými v tuto chvíli nad velkým okem. (F) Polyp téměř přeměněn v medúzu. Nejpozději během jednoho dne dojde k jejímu uvolnění a otočení. Na krajích zvonu jsou patrná, pro juvenilní medúzu typická, první čtyři chapadla a mezi nimi rhopalía.



**Obr. 15: J2 krystalin ve vývoji očí.** V jedné řadě vždy ten samý preparát: překryv signálu J2 s DAPI (jádry), jen J2, jen DAPI a ve viditelném spektru. (A) Řez velkým okem s čočkou dospělé medúzy. (B) Řez velkým okem s čočkou týden staré medúzy. (C) Řez malým okem s čočkou týden staré medúzy. (D) Řez velkým okem s čočkou okem právě uvolněné medúzy. (E) Difúzní lokalizace v buňkách budoucí čočky velkého oka ve stádiu metamorfujícího polypa.



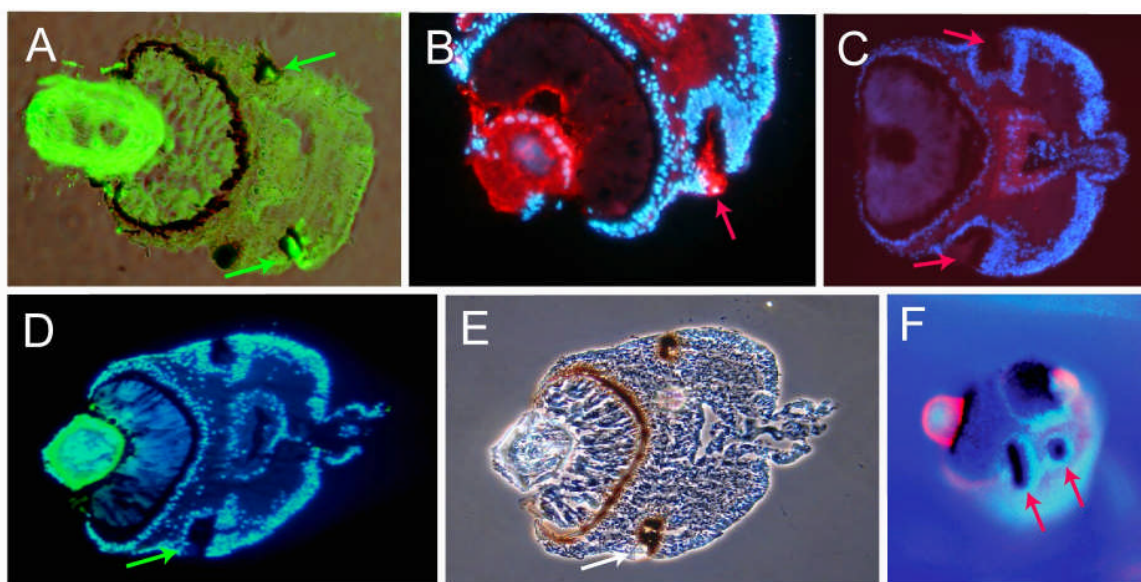
**Obr. 16: IHC a anti J2 krystalin protilátka, barven celý metamorfující polyp.** První stádium, kde je produkován J2 krystalin již buňkami tvořící se čočky (odpovídá mladšímu D z přehledu Obr. 14), a to nejprve v čočkách velkého oka (zelené šipky směřují na čočky). (A) Viditelný obraz z konfokálního mikroskopu s překrytým fluorescenčním signálem. Pozice čtyř rhopalí vyznačena tečkovanou čarou. Patrná je typická tetaradiální souměrnost (čtyři laloky). (B) Ten samý polyp i pohled. Složení několika rovin z konfokálního mikroskopu; pouze fluorescenční signál. Čočky opět označeny šipkami.

### 7.5.3 Přítomnost krystalinů v menších očích rhopalia: pitu a slitu

Screening J1 a J2 krystalinů IHC metodou v rhopaliích naznačil přítomnost J1 také v slitu a pitu. Pro ověření a detailnější charakterizaci lokalizace obou krystalinů byly připraveny mrazové řezy těmito menšími oky (*ocelli*). J1 krystalin byl prokázán opakovaně v slitu, jak v čočce, tak v retině (ve vnějším segmentu fotoreceptorů). Výsledky charakterizace J1 v jamkovitém oku (pitu) byly pozitivní jen pro několik řezů (řezy centrem pitu) a to v oblasti před stínícím pigmentem (fotoreceptorová vrstva).

J2 krystalin se v pitu ani slitu nepodařilo prokázat. Jednotlivá barvení shrnuje Obr. 17.

Tato diferenciální exprese krystalinů je diskutována v sekci Diskuze v souvislosti s vývojem jednotlivých očních typů *T. c.*



**Obr. 17: J1 a J2 krystalin v pitu a slitu.** (A) J1 krystalin - překryv fluorescenčního a viditelného pole: čočka velkého oka zcela vlevo, horní šipka ukazuje na pit, dolní na slit. (B) J1 krystalin, šipka ukazuje na příčný řez slitem. (C) Negativní kontrola (pozadí metody): bez primární protilátky. (D) Absence J2 krystalinu v slitu (zelená šipka); pozitivní čočka velkého oka vlevo. (D) Tentýž řez ve světelném mikroskopu s fázovým kontrastem, bílou šipkou označena světlolomná konkrce (čočka) ve slitu. (F) Barvení celého rhopalia protilátkou proti J2 krystalinu. Šipky ukazují na slit (vlevo) a pit bez produkce J2 krystalinu (červeně). Vyjma (A) a (E) jsou jádra značena modře pomocí DAPI.

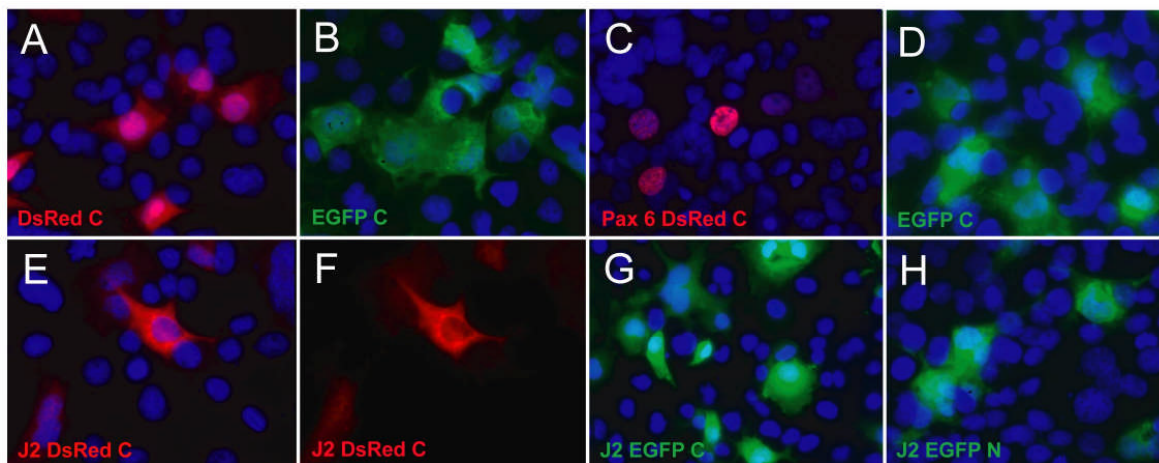
### 7.5.4 Buněčná lokalizace J2 krystalinu

Jedním z cílů této práce bylo lépe charakterizovat nový krystalin J2. Protein byl poprvé popsán v souvislosti z jeho přítomností v homogenizátu z čoček *T. c.* a v současné době je považován za jeden ze dvou krystalinů (případně tří viz Přehled literatury) čoček této čtyřhranky. Vzhledem k tomu, že krystaliny jsou cytoplazmatické solubilní proteiny a tyto žahavčí nebyly nikdy dostatečně charakterizovány, bylo důležité ověřit tyto vlastnosti i pro J2 krystalin.



Byla připravena translační fúze J2/EGFP (varianta GFP s posunem excitačního maxima pro jasnější fluorescenci) a J2/DsRed (červený fluorescenční protein) ve vektoru pro expresi v savčích buňkách (s CMV promotorem). Transfekovány byly COS7 buňky (transformované opičí fibroblasty) a jako kontrola použity vektory pouze s EGFP či DsRed (převážně cytoplazmatická lokalizace) a s Pax6/DsRed (jaderná lokalizace).

J2 se jevil cytoplazmaticky lokalizovaný a exprimovaný homogenně v celé cytoplazmě COS7 buněk, což potvrzuje jednu z typických vlastností krystalinů i pro tento protein.



**Obr. 18: Buněčná lokalizace J2 krystalinu.** COS7 buňky 48 hod po transfekci plazmidem. Jako kontrola funkčnosti metody: Pax6 transkripční faktor (C) a odpovídající jaderná lokalizace. (A), (B) a (D) plazmidy bez inzertu s převážně cytoplazmatickým EGFP či DsRed, (E) – (H) s kompletním ORF J2 krystalinu pro různé typy fúzí: C – J2 je na C konci EGFP; N – J2 je na N konci EGFP. J2 je lokalizován výhradně cytoplazmaticky (např. srovnání A a E). Modře jsou značena jádra pomocí DAPI.

## 7.6 Histologická barvení

Nepřímé metody jako histologická barvení jsou obvykle spíše doplňkovými. V tomto případě byly vhodné, neboť nejsou z větší části závislé na dostupnosti specifických epitopů. Výstupy z IHC mohly být značně ovlivněny nedostupností proteinových antigenů v centrálních partiích čočky, kde vysoká koncentrace proteinů činí materiál velmi rigidním a napohled téměř krystalickým. Centrální partie čoček tak nemusí být stoprocentně přístupné protilátkám. Tudíž výstupy z IHC na velkých očích s čočkou, za účelem popisu proteinového původu refrakčního gradientu, nemusely být zcela průkazné. Histologická barvení umožnila podrobit analýze čočku jako celek, bez omezení danými charakterem materiálu (jako je zmiňovaná krystalická fáze v centru čočky). Histologické techniky jsou založené zejména na chemicko – fyzikálních vlastnostech dané tkáně (obvykle je afinita barviva závislá na pI tkáně a na dalších přísadách v barvicím roztoku) a ani zde v centrech čoček nebylo pozorováno jakého-li nekonzistentního chování barviv, tak jak tomu mohlo být při vizualizaci protilátkami.

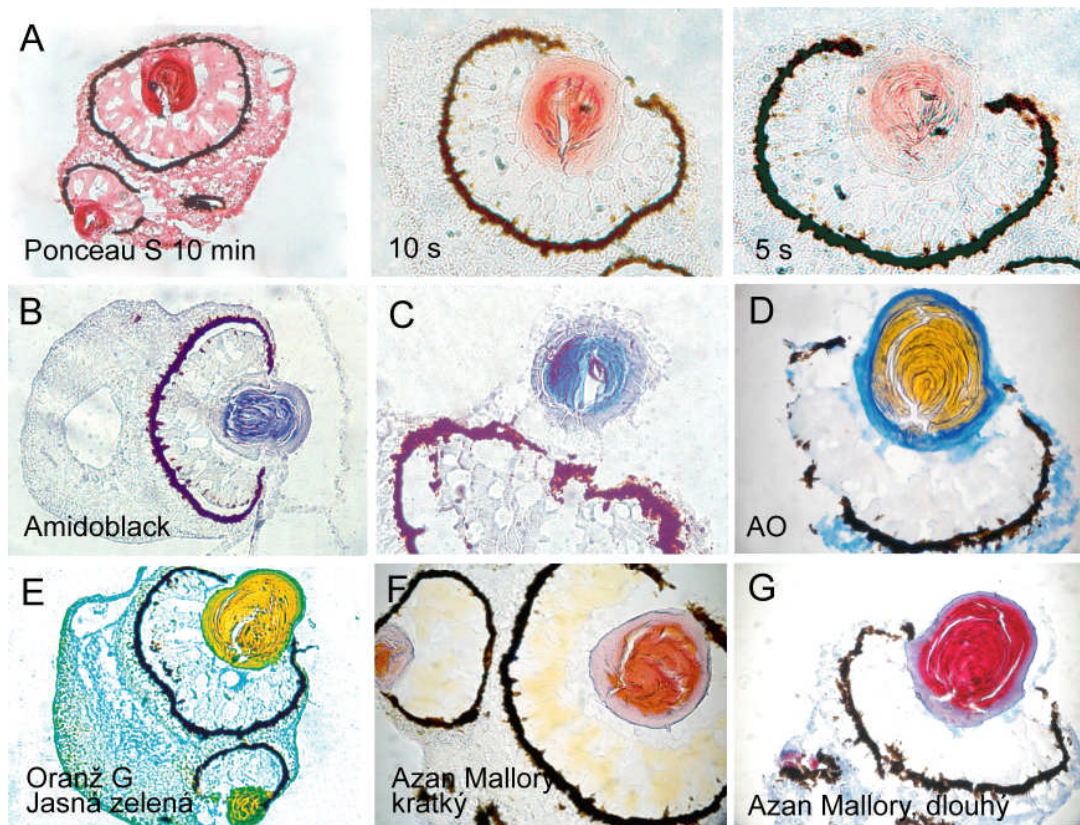
### 7.6.1 Histologie: proteiny v čočkách komplexních očí

Tato histologická barvení byla připravena za účelem zviditelnění a potvrzení proteinového charakteru gradientu refrakčního indexu. Protože přítomnost anorganické složky čočky s refrakčními vlastnostmi byla vyloučena, dalším materiálem, který lze vzít úvahu jsou právě proteiny. Z předchozí části výsledků vyplynulo, že barvení J1 a J2 specifickými protilátkami neprokázalo přímo jejich pozitivní gradient ve směru do centra čočky, což však mohl být artefakt metody způsobený diskutovanou nedostupností centra čočky protilátkám. Histologické techniky vizualizující tkáň dle množství proteinů a případně jejich charakteru, se tak staly alternativou k IHC metodě.

Mrazové řezy napříč čočkami byly barveny jednoduchými roztoky oranže G, Ponceau S a amidočerní 10B, což jsou obecnými proteinovými barvivy. Dále byly aplikovány metody specificky zviditelňující proteiny určitých vlastností (Azan Mallory barvení, jednoduché barvení anilínovou modří a oranž G či jasnou zelenou s oranží G).

Již barvení samotnou oranž G ukázalo na vysokou koncentraci proteinů. Ponceau S poskytovalo po různých dobách inkubace řezů v roztoku rozdílně intenzivní zbarvení čočky, což po optimalizaci této inkubační doby umožnilo částečně vizualizovat proteinový gradient a výborně odlišit obsahem proteinů vnitřní a vnější část čočky (Obr. 19, řada A). Amidočerní 10B jako alternativa k Ponceau S barvila čočky víceméně homogenně, ale i s tímto barvivem bylo po vhodné době inkubace možné odlišit na proteiny bohatší vnitřní část čočky a vnější část (Obr. 19, B a C).

Azan Mallory barvení, technika původně vyvinutá pro barvení kolagenu v pojivových tkáních, také prokázala rozdílný charakter centra čočky a vnějších partií. Navíc výsledek barvení poukázal na kolagenní charakter periferní části čočky v oblasti překrývající se s oblastí s nejvyšší afinitou J2 protilátky (Obr. 19 F a G). Kolagenní charakter tohoto pásu potvrdilo i barvení směsí oranž G a jasné zelené, kde jasná zelená barví v tomto uspořádání proteiny kolagenní povahy a oranž G by měla barvit především proteiny svojí vlastností podobné keratinům. Čočky takto barvené mají výrazně zelenou (barvivo jasná zelená) vnější část a žlutou centrální část čočky (oranž G) (obr. 19 E). Azan Mallory barvení, kde anilínová modř je kolorantem kolagenních materiálů a oranž G keratinových a míst s vysokým obsahem proteinů (oranžové barvení u krátké inkubace Azan Mallory; při dlouhé inkubaci přebarveno azokarmínem), tak bylo ve shodě s tímto barvením a společně silně poukázaly na skutečnost, že vnější část čočky je kolagenního charakteru, kdežto vnitřní svými vlastnostmi připomíná keratin. Toto podporuje i jednoduché barvení pouze anilínovou modří a oranží G (Obr. 19 D).



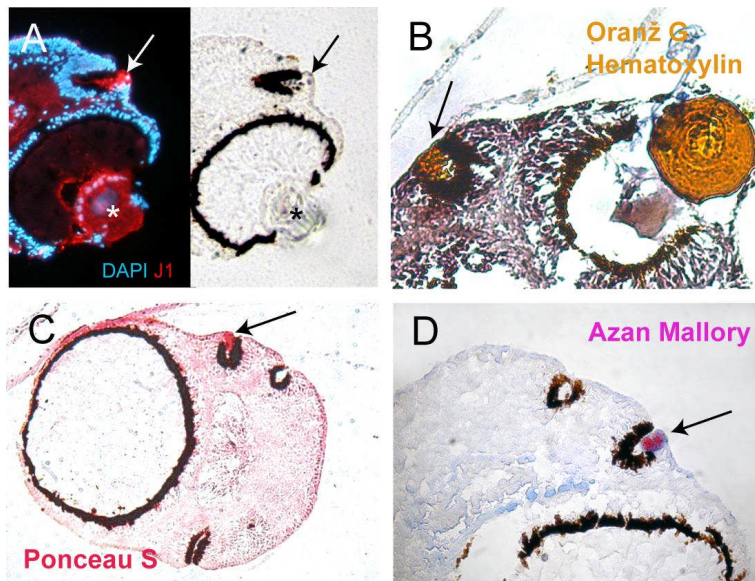
**Obr. 19: Histologická barvení prokazující rozličnou koncentraci proteinů v různých částech čočky a odlišný charakter její vnější a vnitřní části. Řada (A): barvení proteinů ve velké čočce; při kratších barveních lze již pozorovat stoupající koncentraci ve směru do centra čočky. (B) Barvení proteinů ve velké čočce amidočerní. (C) Barvení proteinů v malé čočce amidočerní. (D) AO – anilínová modř, oranž G: barvení vizualizuje odlišný charakter obou částí čočky. (E) Oranž G a jasná zelená jsou součástí barvicího roztoku poukazujícího na přítomnost kolagenu podobného materiálu ve vnější části čočky a na bohatost proteinů a jejich keratinovou povahu v centru čočky. (F) Azan Mallory barvení (10 min v azokarmínu) s obdobným výsledkem. Centrum čočky je barveno více oranž G než azokarmínem, patrné je i relativně homogenní barvení retiny oranž G (žlutě proteiny). (G) Azan Mallory (40 min v azokarmínu), výraznější barvení kolagenního charakteru vnější části čočky velkého oka.**

## 7.6.2 Histologická charakteristika pitu a slitu

Předchozí barvení byla zaměřena na čočky velkých očí a proteinový gradient. Čočky podobná struktura se však nachází i v slitu a tak dalším cílem bylo histologicky charakterizovat i *ocelli* (pit a slit), zvláště po nález J1 krystalinu ve slitu.

Byly tedy připraveny řezy různými rovinami pitu a slitu a pro charakterizaci byla použita stejná barvení jako v případě velkých čoček a navíc obecné barvení hematoxylin/oranž G.

Histologická barvení prokázala, že čočka slitu je svým charakterem velmi podobná čočkám velkých očí. Výsledná barvení byla velmi obdobná pro obě tkáně (Obr. 20)



**Obr. 20: Charakter malých očí.** Čočka pitu (šipky) vykazuje stejný charakter jako čočky velkých očí, jak z hlediska barvení protilátkou proti J1 krystalinu (A), tak různých histologických barvení (B, C, D). Typ použité metody je vyznačen přímo v obrázku.

## 7.7 Studium exprese vybraných genů: konzervace genů obratlovců a žahavců

Z rhopalií *Tripedalia cystophora* byla již v minulosti v naší laboratoři připravena EST knihovna. Jednotlivé EST byly porovnány s genomy šesti různých organismů a tak, jak bylo již naznačeno v předchozích studiích na korálu *Acropora millepora*, bylo nalezeno mnoho obratlovcích homologů k jednotlivým genům, včetně těch podílejících se na vývoji očí a výstavbě fototransdukční kaskády. Překvapivě bylo zjištěno, že mnoho z genů, které jsou konzervovány mezi čtyřhrankou *Tripedalia cystophora* a obratlovcem (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*) bylo v průběhu evoluce ztraceno v liniích vedoucích k octomilce či háďátku. Tato konzervace genových sad žahavců a obratlovců je pozoruhodná.

Cílem této části diplomové práce bylo jednak optimalizovat protokol pro RNA ISH pro rhopalia *T. c.* a dále pomocí této metody vizualizovat přítomnost vybraných zajímavých genů (jejich mRNA) tak, aby ze vzoru exprese bylo možné čerpat nové informace o potenciální funkci či vlastnostech studovaného genu, respektive proteinu. Charakterizována byla exprese (na úrovni mRNA) *T. c.* MITF, *T. c.* RFamid a *T. c.* selenoprotein O.

### 7.7.1 MITF

Pro studii odhalující, že oko *T. c.* je stavěno z podobných komponent jako oko obratlovců (ciliární typ opsinu; melanin jako stínící pigment apod.) KOZMIK *et al.* (2008) byla



charakterizována transkripce MITF (transkripční faktor asociovaný s mikrooftalmií). Tento transkripční faktor se u obratlovců podílí mimo jiné i na vývoji melanocytů a tvorbě pigmentace retiny (pigmentovaného epitelu retiny) HEMESATH *et al.* (1994), OPDECAMP *et al.* (1997). Jeho mutace u lidí způsobují Waardenburgův syndrom typu II manifestovaný hluchotou, hypopigmentací kůže, malformacemi očí aj. NOBUKUNI *et al.* (1996). Překvapivě byly nalezeny homology pro MITF, původně popsáno u myši, i v genomech některých bezobratlých HALLSSON *et al.* (2007, HALLSSON *et al.* (2004). Po nálezů genu s homologií k MITF i u *T. c.* tak bylo extrémně zajímavé zjistit, zda se i zde bude jednat o regulátor s významem pro vývoj očí a zda mRNA bude lokalizována alespoň v některém z typů očí *T. c.*

Podarilo se prokázat expresi *T. c.* MITF v rámci rhopalia. mRNA se nachází v prodloužení fotoreceptorových buněk v kruhovém vzoru, bezprostředně za melaninovými depozity v retině. Navíc byla pozorována lokalizace transkriptů ve vnější části čočky (Obr. 22 A), což je ve shodě s teorií vzniku čočky *T. c.* z pigmentované fotoreceptorové buňky (viz Diskuze).

## 7.7.2 RFamid prekurzor

Protože pro funkční význam oka je nezbytné zpracování vizuální informace nervovou soustavou, byl charakterizován v EST knihovně náhodně nalezený gen pro RFamid prekurzor, a to ve snaze objasnit zpracování vizuální informace v rhopáliu.

RFamidy jsou peptidové nervové přenašeče primárně popsány u bezobratlých, které jsou dnes však známé i u savců DOCKRAY (2004). Tyto neuropeptidy jsou hojné především v evolučně „starých“ nervových systémech, jakými jsou nervové systémy žahavců. Získaná sekvence z *T. c.* vykazuje největší podobnost s Pol-RFamid prekurzorem z hydromedúzy *Polyorchis penicillatus* SCHMUTZLER *et al.* (1994), nervovým přenašečem skupiny příbuzné FMRFamidům. Na sekvenci větší části z prekurzorového proteinu jsou jasně patrné peptidové sekvence (Q)WLRGRFGRE (Obr. 21). RFamid prekurzory jsou posttranslačně štěpeny za vniknutí několika peptidů z jediného prekurzoru. Tento prekurzor je často kódován jediným genem, tak jak je tomu u *T. c.*

REFALTWLRGRFGREASDQWLRGRFGREATAQWLRGRFGREAMDQWLRGRFGRDVADQWL  
 RGRFGREVDGQWLRGRFGREVATQWLRGRFGREAAEQWLRGRFGRQLEEDIEDEPFDR  
 DQWLRGRFGRETEQWLRGRFGKRESNEQWLRGRFGREMDQWLRGRFGREAEQWLRGRFGR  
 ETEQWLRGRFGREADQWLRGRFGRELEQWLRGRFGREAEQWLRGRFGRESKSEDAVEQW  
 LRGRFGRELEQGGFEGENSLGSAMDSNVARAVKTEGSSAAVGVKQDQRQDSSKVEAELSAQ  
 GSISEKRNL

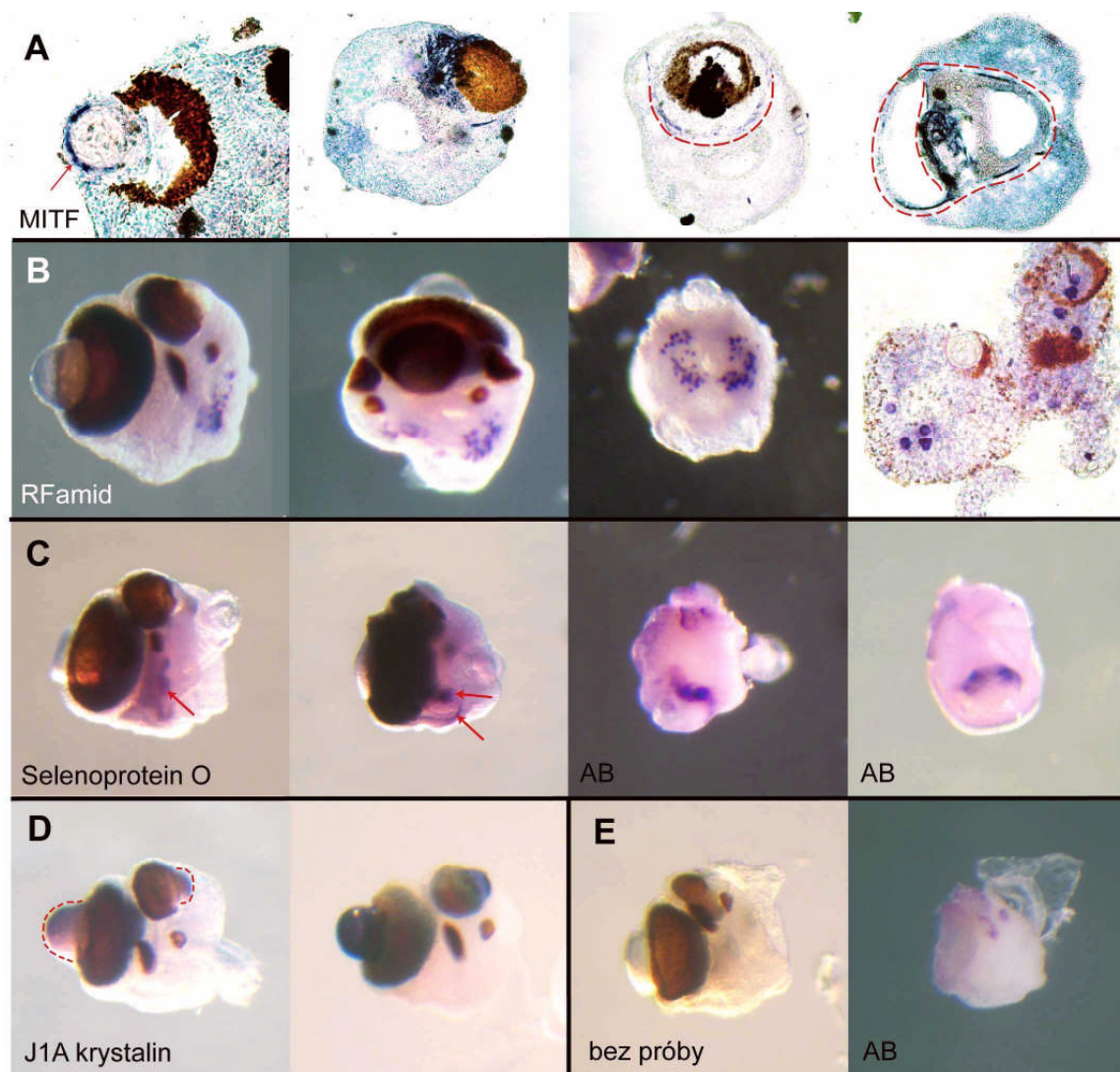
**Obr. 21:** Pol-RFamid *Tripedalia cystophora*. Tmavě je znázorněna konzervovaná sekvence neuropeptidu, podtržena je C-terminální sekvence RFamidu a kurzívou je vyznačena konzervovaná sekvence nezbytná pro štěpení prekurzoru, kde největší význam má Glu.

RFamid z *T. c.* byl v rámci rhopalia exprimován jedinou větší skupinou neuronů obklopující symetricky stopku rhopalia (Obr. 22 B). Podobná nicméně o mnoho menší skupina byla popsána v článku SKOGH *et al.* (2006) na základě barvení RFamidovou protilátkou v blízkosti zásoby více než 2000 dediferencovaných buněk v zadní části rhopalia (také u stopky).

### 7.7.3 Selenoprotein O

Jedním z vybraných genů byl i zástupce oněch mezi *T. c.* a obratlovci konzervovaných genů (přítom chybějících u octomilky i háďátka), selenoprotein O. Cílem bylo potvrdit, že je nejen přítomný v genomu *T. c.* (a případně na nějaké minimální hladině transkribován, tak aby se mohl ocitnout ve zmiňované cDNA knihovně), ale že je skutečně transkribován, a to se specifickým vzorem exprese, odpovídajícím případně specializované funkci produktu.

Metodou RNA ISH na celých rhopaliích skutečně byla vizualizovaná jeho přítomnost v tkáních rhopalia. Jednalo se o specifickou oblast horního kraje statocysty (Obr. 22 řada C). Jako pozitivní kontrola funkčnosti RNA ISH byla použita ověřená ribopróba syntetizovaná pro J1A krystalin (Obr. 22 D) a jako jedna z negativních kontrol bylo použito totéž barvení bez próby (pozadí metody) Obr. 22 E.



**Obr. 22: RNA *in situ* hybridizace na rhopaliích pro vybrané geny.** Použita byla vypreparovaná rhopalia, případně mrazový řez juvenilní medúzou (řada B, poslední fotografie). Červené šipky a přerušovaná čára vyznačují zásadní či hůře pozorovatelná místa exprese. AB – po odstranění pigmentu. Následuje popis lokalizace pro jednotlivé geny. (A) MITF: čočka malého oka; za pigmentem malého oka – pravděpodobně shluk neuronů a bazální část fotoreceptorů (PR); kruh za pigmentem velkého oka, pravděpodobně bazální část PR

## 8. Diskuze

### 8.1 Gradient refrakčního indexu v čočce

Jak bylo v úvodu práce osvětleno, gradient refrakčního indexu je nezbytný pro dobré vidění vodních živočichů. Potřebují-li udržet kvalitu obrazu – týká se samozřejmě pouze očí se schopností formování obrazu – je tento gradient napříč kulatou čočkou (typický tvar pro vodní organizmy) nutný k redukci sférických aberací, daných tvarem čočky, a tedy ke zkvalitnění obrazu.

U kmene žahavců, živočichů jejichž linie se od hlavní vývojové větve organizmů vydělila již před oddělením bilaterálně symetrických organismů, je pozoruhodná již sama skutečnost, že u nich nalézáme (jako u prvního kmene) oči. Popis komplexních očí s rohovkou, čočkou i retinou byl u třídy žahavců (*Cubozoa*) skutečně fascinující. Objev, že tyto oči jsou schopné zpracovat obraz (nehovoříme teď o jeho zpracování nervovou soustavou, ale optickým aparátem), a že jejich čočkami, stejně jako čočkami vyšších organismů, prostupuje gradient refrakčního indexu, byl překvapující a publikovaný v časopisu *Nature* NILSSON *et al.* (2005). Na otázku jak a z čeho je tento gradient tvořen měla odpovědět část této práce.

Potenciálními materiály, které by se mohly na zvýšení refrakčního indexu v centrálních partiích čoček podílet jsou proteiny, jak je tomu třeba u čoček ryb a anorganické materiály jako např. kalcit u hvězdic. Protože přítomnost anorganického materiálu takovýchto vlastností byla v čočce pomocí rentgenové difrakce vyloučena, zbytek práce je věnován průkazu proteinů, coby tvůrcům tohoto gradientu a tvorbě a charakteru jejich gradientu v čočce. Průřezy čočkami byly nejprve charakterizovány na TEM, což již bylo v minulosti publikováno LASKA - MEHNERT (1985), nicméně nikoli se zaměřením na tuto problematiku a detaily. Nález gradientu elektronové hustoty s maximem v centru čočky potvrdil fyzikálně změřený gradient refrakčního indexu (elektronová denzita koreluje přímo s refrakčním indexem pro toto složení čočky, GARM *et al.* (2008)). V krajních vrstvách buněk čočky bylo nalezeno velké množství ribozómů, přičemž toto množství stoupalo směrem k centru, kde již nebyly ribozómy pozorovatelné. Pozitivní korelace počtu ribozómů s elektronovou hustotou silně podpořila myšlenku na proteinový původ gradientu. Navíc studium vývoje čoček v ontogenezi, kde se směrem do centra přesouvají buňky nejvíce se plnící materiálem s vysokou elektronovou hustotou, tuto hypotézu upevňuje.

V minulosti byly popsány z homogenizátů čoček tři hlavní krystaliny, přičemž lokalizace jednoho z nich (J3) není v čočce je sporná a naopak je zjevná v jiných částech rhopalia. J1 (především) a J2 krystaliny se nicméně skutečně jeví jako hlavní proteiny čočky a tak bylo nasnadě pokusit se potenciální proteinový gradient vizualizovat pomocí jejich barvení. Byly tedy připraveny protilátky rozeznávající tyto proteiny a metodou IHC na řezech i jedincích byla lokalizována jejich produkce. Zpočátku se nedařilo získat signál jinde než v periferních vrstvách čočky a to ani po

použití různých antigen odmaskujících technik. Po aplikaci optimalizace metody pro zvýšení specifity protilátky (mimo jiné zahrnující také 2 – 3 denní inkubaci s primární protilátkou) však bylo možné J1 krystalin vizualizovat v poměrně homogenním rozložení v celé ploše čočky, i když zcela v centru byl znatelný slabý pokles. J2 krystalin byl však vždy lokalizován pouze v okrajových vrstvách čočky.

To není zcela v souladu s výsledky elektronové mikroskopie, nicméně lze takový výsledek vysvětlit hned několika způsoby. Jednak lze předpokládat, že při takové hustotě proteinů v centrální části čočky (75%) nebylo možné ani použitými metodami dostatečně odhalit epitopy krystalinů tak, aby byly přístupné protilátkám i v centru a mohly jsme jimi vizualizovat krystalinový gradient. Dále je možné, že na ustavení proteinového gradientu se podílejí větší měrou ještě jiné proteiny než J1 a J2 krystlin.

Zaměříme-li se na J2, výsledky ukázaly i po všech úpravách metod na velmi rozdílnou expresi v porovnání s J1. To lze interpretovat funkčně, ale i jako artefakt. Samozřejmě je možné a řekneme pravděpodobněji, že díky odlišné povaze (pI, velikost apod.) plní tyto proteiny role krystalinů v různých částech čočky, např. pro jejich rozdílný potenciál pro zvyšování refrakčního indexu. Velmi jednoznačně barvené pro J2 krystalin tuto myšlenku výrazně podporuje, protože v čočce, kromě periferních vrstev, není téměř ani náznak jeho přítomnosti. To je však možné vysvětlit i tak, že J2 protilátka je ještě citlivější vůči nedostupnosti antigenů v centru čočky, a že J2 krystalin je možná k tomuto chování náchylnější než J1.

Protože tedy protilátky proti hlavním krystalinům nepotvrdily jednoznačně výsledky z elektronového mikroskopu a tak přímo neprokázaly proteinový charakter refrakčního gradientu, hledala se alternativní metoda pro jeho průkaz. Bylo tedy testováno několik histologických barviv a postupů, kterými je možné proteinový gradient vizualizovat. Tato barvení, zejména Ponceau S, nakonec skutečně ukázala na přítomnost rozdílných koncentrací proteinů v rozdílných částech čočky, s maximem v centru a klesající koncentrací směrem k periférii. Potvrdily tak proteinový původ gradientu a navíc poukázaly na specifické vlastnosti vnější „kapsule“ čočky a vnitřní části. Barvení opakovaně poukázala na materiál s vlastnostmi podobnými kolagenu ve zmíněné periferní části, kde by kromě refrakčních vlastností mohl dobře hrát i roli podpůrnou a napomáhat tak k udržení integrity čočky. To by mohlo dávat smysl již proto, že kolagen skutečně obecně nalézáme, jak v čočce, tak v rohovce (popsáno především u savců). Kolagen typu čtyři (tropokolagen) je například u lidí typický kolagen bazální laminy a čočky, kde je exprimován v *capsula lentis* (pouzdro na povrchu čočky) KELLEY *et al.* (2002).

Vnitřní část čočky *T. c.* se všemi metodami barvila odlišně od vnější a prokazovala charakter na proteiny extrémně bohaté tkáň, což také odpovídá výslednému obrazu o rozložení proteinů v čočce. Proteiny vnitřní části mimo to vykazovaly při barvení charakter keratinu podobného materiálu. Keratin je přitom běžnou součástí rohovky některých organismů (především cytokeratin 3 + 12). Nicméně barvení obecnou komerční cytokeratinovou protilátkou na řezech čočkou *T. c.*

prokázalo jeho přítomnost pouze ve vnější části čočky, vnitřní část čočky byla buď protilátkám nepřístupná či cytokeratin detekovatelný touto protilátkou neobsahuje (neprezentovaná data).

## 8.2 Čtyři odlišné typy očí v rámci jednoho smyslového orgánu

Je těžké představit si vizuální nároky živočicha, který se živí aktivně lovem malých korýšů (vplouvá za nimi do světelných kuželů, kde se mu nalepí na chapadla) a potřebuje být schopen vyhnout se kořenům stromů v příbřežních zónách, které obývá. Ještě obtížnější je, představit si, kolik z toho dokáže se svojí dobrou, ale zdaleka ne dokonalou nervovou soustavou využít. Zdá se však, že mnohem více než bychom očekávali, protože i epigamní chování vyúsťující v předání spermatoforu samici (přičemž se obě medúzy drží za chapadla) je nejspíše také vizuálně řízené. A skutečnost, že celým orgánem je natáčeno a dokonce lze přicloňovat velké oko s čočkou naznačuje, že bohaté vybavení tohoto orgánu nebude bezcílné, ale právě nejspíš přizpůsobením komplexnímu životnímu stylu těchto medúz, který je mezi žahavci unikátní. V nedávno publikovaném článku charakterizujícím pit a slit byla dokonce vedena úvaha o rozdílných funkcích čtyř typů očí čtyřhranek a o jejich vzniku postupnou optimalizací k účelu, který momentálně plní např. slit jako pravděpodobný senzor vertikálního pohybu GARM *et al.* (2008).

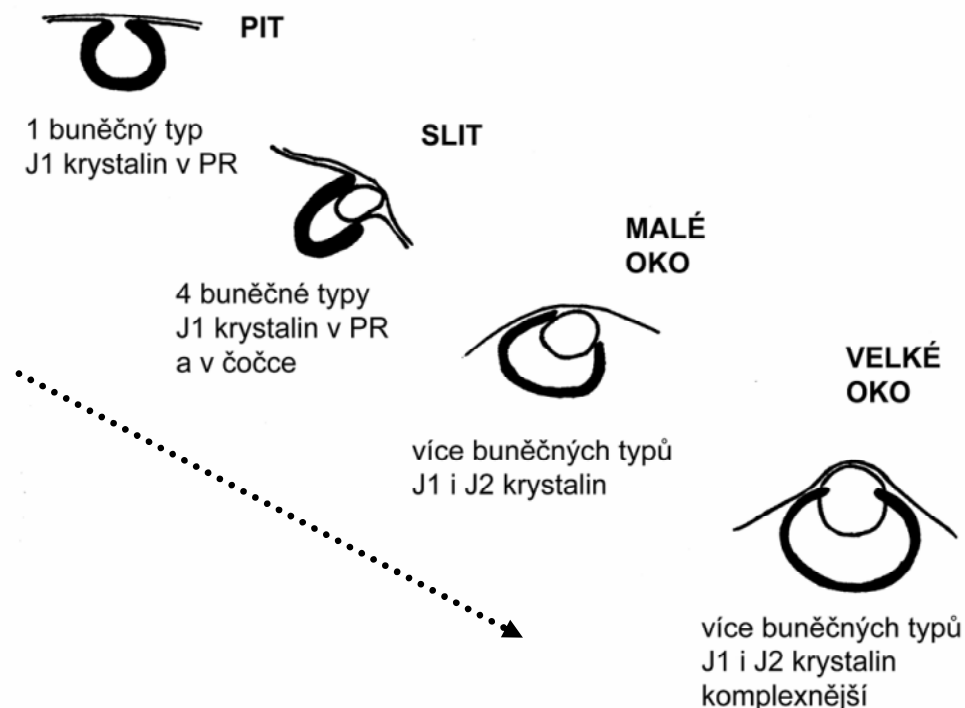
Tato práce je zaměřena mimo jiné na společnou charakteristiku pitu, slitu, malého a velkého oka s čočkou. Z výsledků J1 a J2 lokalizačních experimentů a histologických barvení vyplynulo, že sdílí mnoho společného nejen na morfoloogické úrovni, ale že zde lze sledovat jistý trend od nejjednoduššího pitu až k nejkomplexnějšímu velkému oku s čočkou. Z morfoloogického hlediska je to nárůst počtu buněčných typů a složitosti výsledného oka. Podíváme-li se na produkci jednotlivých krystalinů, nalézáme v pitu a slitu jen J1 krystalin (Obr. 17 a 20). J2 se jeví jako vylepšení až velkých komplexních očí a jejich čoček. Přičemž J1 krystalin nacházíme nejprve pouze v pigmentovaných fotoreceptorech (což je jediný buněčný typ pitu), ale ve slitu již, jak ve fotoreceptorech, tak v čočce. U velkých komplexních očí navíc nalézáme J1 krystalin kromě čoček také částečně v části retiny sousedící s čočkou (při použití J1 – P protilátky, při její relativně vysoké koncentraci a inkubaci přes noc při pokojové teplotě čili lze diskutovat o specifitě tohoto barvení a případném artefaktu). Každopádně by tato zbytková syntéza v retině poukazovala na původní výskyt J1 krystalinu, jak naznačila barvení pitu.

J2 nalézáme až v čočkách malého a velkého komplexního oka a i po všech pokusech o odhalení epitopů v centru čočky (které výrazně pomohly J1 protilátce) její lokalizaci pozorujeme pouze ve vnější části čoček. Lze si tak představit scénář, ve kterém je J1, do té doby jeden z mnoha proteinů fotoreceptorů, rekrutován do role krystalinu, nejprve možná dosti náhodně na základě jeho vhodných vlastností a lokalizace exprese. Kromě fotoreceptorových buněk pitu pak vznikl nový specializovanější buněčný typ odvozený od fotoreceptorů (nebo jejich progenitorů) exprimující J1 krystalin a tvořící masu podobnou čočce v jamce slitu. Tato čočka mohla být předchůdcem

vícevrstevných čoček komplexních očí, které v celé své ploše exprimují J1 krystalin. J2 krystalin pak v průběhu vývoje těchto komplexních očí mohl být rekrutován jako vylepšení vlastností periferních částí čočky, kde je výhradně produkován.

Tak lze v zásadě považovat pit za předchůdce slitu, jehož vyvinutější formou by mohlo být malé oko s čočkou, kde je čočka, obdobně jako čočka slitu, umístěna v asymetrické retině. Nejpokročilejším typem je pak velké komplexní oko s čočkou, které je oproti malému doplněno o schopnost přicloučení aj. Pit a slit tak lze chápat jako předchůdce složitějších očních typů, jako jakési mezikroky. Vezmeme-li to do důsledků, lze říci, že vše začalo u pitu tvořeného pouze pigmentovanými fotoreceptory a tak i čočka velkých očí má původ v pigmentové buňce, což koneckonců naznačuje i exprese MITF, transkripčního faktoru řídicího mj. pigmentaci v oku, v rhopaliích *T. c.* Teorii vývoje čtyř očních typů *T. c.* shrnuje Obr. 23.

Rhopalium je tak skutečně unikátním orgánem, kde možná v jedinou chvíli pozorujeme evoluci očních typů vedoucích ke vzniku relativně složitěho oka s čočkou, oka čtyřhranky. *Tripedalia cystophora* je tedy unikátní model i z hlediska utváření našich představ o možném vzniku komplexních očí.



**Obr. 23: Evoluce očních typů *Tripedalia cystophora*.** Schéma ilustrující možný scénář vzniku různých očních typů čtyřhranky z původního jednoduchého očního pohárku (pitu). Směr vývoje od nejjednoduššího k nejsložitějšímu je naznačen tečkovanou šipkou. PR – fotoreceptor.

### 8.3 Genové sady žahavců a obratlovců: překvapivě blízko

Jak již bylo v úvodu práce uvedeno, zdá se, že žahavčí a obratlovčí genová výbava je poměrně dobře konzervovaná. Celogenomová hledání proti EST knihovně z rhopalia *T. c.*, stejně tak jako z *Acropora milepora* poukázala na ztrátu mnoha genů v liniích vedoucích např. k háďátku či octomilce a naopak na udržení mnoha z těchto genů u žahavců i obratlovců. Kromě toho se mnoho genů, které jsou typické pro oči obratlovců (např. pro obratlovce specifické komponenty fototransdukční kaskády) podařilo v EST knihovně nalézt či cíleně doklonovat KOZMIK *et al.* (2008).

Třetí část této práce tak byla zaměřena na charakterizaci exprese z tohoto hlediska třech zajímavých genů (Obr. 22). Jsou jimi MITF, výše popsáný transkripční faktor podílející se na vývoji očí, zejména pigmentace, popsáný především u obratlovců. RFamid, nervový přenašeč, charakterizovaný pro svoji potenciální úlohu v přenosu nervových signálů z/do rhopalia. A konečně selenoprotein O, zástupce genů konzervovaných mezi žahavci a obratlovcem, ale ztracený v liniích vedoucích k octomilce či háďátku.

Lokalizace mRNA MITF v rhopaliu byla diskutována výše jako jeden z argumentů pro možný původ komplexních očí *T. c.* z původně pigmentovaných fotoreceptorech. Mimo to se jedná o jeden z důležitých genů pro vývoj očí, které v této funkci sdílí, tak jako řadu jiných genů, jak obratlovcem, tak žahavci KOZMIK *et al.* (2008).

**Pol-RFamid**, jak byl tento neuropeptid *T. c.* na základě podobnosti proteinové sekvence klasifikován, nalézáme v rámci rhopalia u skupiny buněk kolem stopky, na které rhopalium visí a kterou je vedeno veškeré nervstvo spojující smyslová a jiná nervová jádra v rhopaliu s hlavním nervovým provazcem kolem medúzy. Toto spojení je klíčové pro ovládání svalů medúzy, které jsou inervovány až z nervového kruhu, především jeho ganglií. Vzhledem k tomu, že již v minulosti byla na základě protilátkových barvení charakterizována RFamid pozitivní nervová vlákna vybíhající z nervových jader v rhopáliu a přijímající nejspíše signály z očí COATES (2003), lze spekulovat, zda se i tato Pol-RFamid pozitivní skupina neuronů účastní zpracování vizuální informace z rhopalia a nepředává tak dále skrze stopku signál směrem ke konečným efektorům, svalům.

Samozřejmě, původem většiny sekvencí *T. c.* je cDNA knihovna z rhopalií či larev. Z toho vyplývá, že transkripční aktivita těchto genů by měla být zajištěna již jejich přítomností v knihovně. Cílem tedy nebylo pouze potvrdit expresi **selenoproteinu O**, ale také posoudit v jaké míře je v dospělém rhopaliu takový gen transkribován a zda lze ze vzoru jeho exprese na úrovni mRNA zjistit něco o jeho případných vlastnostech. Kouzlem tohoto modelového organismu je mimo jiné i prozatímní existence pouze několika v literatuře funkčně popsaných genů, a tak je každá informace je skutečně cenná.



Z výsledků vyplynulo, že selenoprotein O čtyřhranky *T. c.* je nejsilněji exprimován v zadní stěně statocysty (Obr. 22 C), což je zajímavé, pokud si uvědomíme, že je to i místo lokalizace J1 krystalinu, proteinu příbuzného selenoproteinům. Navíc ztráta selenoproteinu O u octomilky a háďátka a jeho zachování v *T. c.* a některých obratlovcích je i v souladu s daty a závěry z nedávno publikovaného článku Lobanova a kolegů LOBANOV *et al.* (2007). Tato práce analyzuje selenoproteiny mnoha organismů a sleduje trendy ve vývoji selenoproteinů v evoluci. Výsledky poukazují na skutečnost, že více než polovina selenoproteinových rodin je konzervovaná mezi jednobuněčnými eukaryoty a savci, z čehož plyne velmi starobylý původ této skupiny. Analýzy dále ukázaly na nezávislé masivní ztráty mnohých z těchto genů u některých skupin organismů, jmenovitě u suchozemských rostlin, hub (*Fungi*), hlístů (háďátko), hmyzu (octomilka) a některých protist. Celkové porovnání množství v současné době v genomech přítomných selenoproteinů nakonec odhalilo evidentní závislost počtu selenoproteinů na vodním či suchozemském typu života. Vodní rostliny i živočichové (jako i čtyřhranka) si podrželi a v některých případech i rozšířili své selenoproteomy, kdežto suchozemské organismy mnohé selenoproteiny ztratili, někdy zcela kompletně. Zdá se tedy, že život ve vodním prostředí nejspíše podporuje utilizaci selenu a naopak u suchozemských organismů zde hraje důležitou roli neznámý faktor prostředí, snižující využitelnost tohoto prvku.

## 9. Souhrn

V rámci diplomové práce bylo:

- prokázáno, že **gradient refrakčního indexu** v čočkách velkého a malého komplexního oka čtyřhranky *Tripedalia cystophora* je **proteinového původu**, tak jak je tomu např. i u obratlovců.
- lépe charakterizován nový **J2 krystalin**. Bylo demonstrováno, že se jedná o **cytoplazmatický** protein, **přítomný pouze v rhopaliích** *Tripedalia cystophora* (čočky, epitel statocysty).
- navržena **teorie** osvětlující vznik **čtyř odlišných typů očí v rámci jednoho smyslového komplexu** a to především v závislosti na výsledcích studia morfologie a rozdílné exprese J1 a J2 krystalinů.
- v souvislosti s úvahami o konzervaci genové sady **žahavců a obratlovců** bylo prokázáno, že **geny**, které jsou mezi těmito skupinami **konzervované** a přesto byly ztraceny v jiných vývojových liniích, jsou u *Tripedalia cystophora* **stále využívány**, přinejmenším exprimované. Pomocí RNA *in situ* hybridizace byla takto potvrzena exprese **selenoproteinu O**, ale také dvou genů podílejících se na utváření zrkového ústrojí *T. c.*, **RFamidu** a **MITF**, které však nepatří mezi geny ztracené v jiných liniích.
- některé z výsledků a shromážděné poznatky byly publikovány ve dvou původních článcích a jednom článku přehledovém. Tyto články jsou součástí příloh diplomové práce.

## 10. Seznam citované literatury

1. Aizenberg, J., Tkachenko, A., Weiner, S., Addadi, L., a Hendler, G. (2001): Calcitic microlenses as part of the photoreceptor system in brittlestars. *Nature*. 412: 819-22.
2. Arendt, D. (2003): Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol*. 47: 563-71.
3. Arendt, D., a Wittbrodt, J. (2001): Reconstructing the eyes of Urbilateria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 356: 1545-63.
4. Becker, A., Sotje, I., Paulmann, C., Beckmann, F., Donath, T., Boese, R., Prymak, O., Tiemann, H., a Epple, M. (2005): Calcium sulfate hemihydrate is the inorganic mineral in statoliths of Scyphozoan medusae (Cnidaria). *Dalton Trans*. 1545-50.
5. Castellano, S., Lobanov, A.V., Chapple, C., Novoselov, S.V., Albrecht, M., Hua, D., Lescure, A., Lengauer, T., Krol, A., Gladyshev, V.N., a Guigo, R. (2005): Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 16188-93.
6. Coates, M.M. (2003): Visual Ecology and Functional Morphology of Cubozoa (Cnidaria). *Integr. Comp. Biol.*: 542-548.
7. Collins, A.G., Schuchert, P., Marques, A.C., Jankowski, T., Medina, M., a Schierwater, B. (2006): Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst Biol*. 55: 97-115.
8. Conant, S.F. (1897): Notes on the Cubomedusae. *Journ Morph*. 10: 8-10.
9. Cuthbertson, R.A., Tomarev, S.I., a Piatigorsky, J. (1992): Taxon-specific recruitment of enzymes as major soluble proteins in the corneal epithelium of three mammals, chicken, and squid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 4004-8.
10. Dockray, G.J. (2004): The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol*. 89: 229-235.
11. Fernald, R.D. (2006): Casting a genetic light on the evolution of eyes. *Science*. 313: 1914-8.
12. Galliot, B., a Schmid, V. (2002): Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *Int J Dev Biol*. 46: 39-48.
13. Garm, A., Andersson, F., a Nilsson, D.E. (2008): Unique structure and optics of the lesser eyes of the box jellyfish *Tripedalia cystophora*. *Vision Res*. 48: 1061-73.
14. Garm, A., Coates, M.M., Gad, R., Seymour, J., a Nilsson, D.E. (2007): The lens eyes of the box jellyfish *Tripedalia cystophora* and *Chiropsalmus* sp. are slow and color-blind. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 193: 547-57.
15. Garm, A., Ekstrom, P., Boudes, M., a Nilsson, D.E. (2006): Rhopalia are integrated parts of the central nervous system in box jellyfish. *Cell Tissue Res*. 325: 333-43.
16. Garm, A., O'Connor, M., Parkefelt, L., a Nilsson, D.E. (2007): Visually guided obstacle avoidance in the box jellyfish *Tripedalia cystophora* and *Chiropsella bronzie*. *J Exp Biol*. 210: 3616-23.
17. Gehring, W.J., a Ikeo, K. (1999): Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet*. 15: 371-7.
18. Gregory, T.R. (2005): The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. *Ann Bot (Lond)*. 95: 133-46.

19. Hadrys, T., DeSalle, R., Sagasser, S., Fischer, N., a Schierwater, B. (2005): The *Trichoplax PaxB* gene: a putative Proto-PaxA/B/C gene predating the origin of nerve and sensory cells. *Mol Biol Evol.* 22: 1569-78.
20. Hallsson, J.H., Haflidadottir, B.S., Schepsky, A., Arnheiter, H., a Steingrimsson, E. (2007): Evolutionary sequence comparison of the *Mitf* gene reveals novel conserved domains. *Pigment Cell Res.* 20: 185-200.
21. Hallsson, J.H., Haflidadottir, B.S., Stivers, C., Odenwald, W., Arnheiter, H., Pignoni, F., a Steingrimsson, E. (2004): The basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor *Mitf* is conserved in *Drosophila* and functions in eye development. *Genetics.* 167: 233-41.
22. Hemesath, T.J., Steingrimsson, E., McGill, G., Hansen, M.J., Vaught, J., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., a Fisher, D.E. (1994): *microphthalmia*, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev.* 8: 2770-80.
23. Horwitz, J. (1992): Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 10449-53.
24. Hoshiyama, D., Suga, H., Iwabe, N., Koyanagi, M., Nikoh, N., Kuma, K., Matsuda, F., Honjo, T., a Miyata, T. (1998): Sponge Pax cDNA related to Pax-2/5/8 and ancient gene duplications in the Pax family. *J Mol Evol.* 47: 640-8.
25. Jagger, W.S. (1992): The optics of the spherical fish lens. *Vision Res.* 32: 1271-84.
26. Jonasova, K., a Kozmik, Z. (2008): Eye evolution: lens and cornea as an upgrade of animal visual system. *Semin Cell Dev Biol.* 19: 71-81.
27. Kelley, P.B., Sado, Y., a Duncan, M.K. (2002): Collagen IV in the developing lens capsule. *Matrix Biol.* 21: 415-23.
28. Kortschak, R.D., Samuel, G., Saint, R., a Miller, D.J. (2003): EST analysis of the cnidarian *Acropora millepora* reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. *Curr Biol.* 13: 2190-5.
29. Kozmik, Z., Daube, M., Frei, E., Norman, B., Kos, L., Dishaw, L.J., Noll, M., a Piatigorsky, J. (2003): Role of Pax genes in eye evolution: a cnidarian PaxB gene uniting Pax2 and Pax6 functions. *Dev Cell.* 5: 773-85.
30. Kozmik, Z., Ruzickova, J., Jonasova, K., Matsumoto, Y., Vopalensky, P., Kozmikova, I., Strnad, H., Kawamura, S., Piatigorsky, J., Vlcek, C., a Paces, V. (2008): Assembly of the Cnidarian Camera-type Eye from Vertebrate-like Components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, přijato do tisku.
31. Kozmik, Z., Swamynathan, S.K., Ruzickova, J., Jonasova, K., Paces, V., Vlcek, C., a Piatigorsky, J. (2008): Cubozoan crystallins: evidence for convergent evolution of pax regulatory sequences. *Evol Dev.* 10: 52-61.
32. Land, M.F., a Nilsson, D.E. (2002): *Animal eyes*, Oxford University Press, Oxford
33. Laska - Mehnert, G. (1985): Cytologische Veränderungen während der Metamorphose des Cubopolypen *Tripedalia cystophora* (Cubozoa, Carybdeidae) in die Medusa. *Helgoländer Meeresuntersuchungen.* 39: 129-167.
34. Lobanov, A.V., Fomenko, D.E., Zhang, Y., Sengupta, A., Hatfield, D.L., a Gladyshev, V.N. (2007): Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. *Genome Biol.* 8: R198.
35. Martin, V.J. (2002): Photoreceptors of cnidarians. *Can J Zool.* 80: 1703-22.
36. Masse, K., Bhamra, S., Eason, R., Dale, N., a Jones, E.A. (2007): Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature.* 449: 1058-62.
37. Nilsson, D.E., Gislén, L., Coates, M.M., Skogh, C., a Garm, A. (2005): Advanced optics in a jellyfish eye. *Nature.* 435: 201-5.

38. Nilsson, D.E., a Pelger, S. (1994): A pessimistic estimate of the time required for an eye to evolve. *Proc Biol Sci.* 256: 53-8.
39. Nobukuni, Y., Watanabe, A., Takeda, K., Skarka, H., a Tachibana, M. (1996): Analyses of loss-of-function mutations of the MITF gene suggest that haploinsufficiency is a cause of Waardenburg syndrome type 2A. *Am J Hum Genet.* 59: 76-83.
40. Nordstrom, K., Wallen, R., Seymour, J., a Nilsson, D. (2003): A simple visual system without neurons in jellyfish larvae. *Proc Biol Sci.* 270: 2349-54.
41. Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M.T., Hodgkinson, C.A., Pavan, W.J., a Arnheiter, H. (1997): Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development.* 124: 2377-86.
42. Parkefelt, L., Skogh, C., Nilsson, D.E., a Ekstrom, P. (2005): Bilateral symmetric organization of neural elements in the visual system of a coelenterate, *Tripedalia cystophora* (Cubozoa). *J Comp Neurol.* 492: 251-62.
43. Piatigorsky, J. (2003): Crystallin genes: specialization by changes in gene regulation may precede gene duplication. *J Struct Funct Genomics.* 3: 131-7.
44. Piatigorsky, J. (2007): Gene sharing and evolution: the diversity of protein functions, Harvard University Press, Cambridge
45. Piatigorsky, J., Horwitz, J., Kuwabara, T., a Cutress, C.E. (1989): The cellular eye lens and crystallins of cubomedusan jellyfish. *J Comp Physiol [A].* 164: 577-87.
46. Piatigorsky, J., Norman, B., Dishaw, L.J., Kos, L., Horwitz, J., Steinbach, P.J., a Kozmik, Z. (2001): J3-crystallin of the jellyfish lens: similarity to saposins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 12362-7.
47. Putnam, N.H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V.V., Jurka, J., Genikhovich, G., Grigoriev, I.V., Lucas, S.M., Steele, R.E., Finnerty, J.R., Technau, U., Martindale, M.Q., a Rokhsar, D.S. (2007): Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science.* 317: 86-94.
48. Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., a Gehring, W.J. (1994): Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science.* 265: 785-9.
49. Satterlie, R.A., a Nolen, T.G. (2001): Why do cubomedusae have only four swim pacemakers? *J Exp Biol.* 204: 1413-9.
50. Schmutzler, C., Diekhoff, D., a Grimmelikhuijzen, C.J. (1994): The primary structure of the Pol-RFamide neuropeptide precursor protein from the hydromedusa *Polyorchis penicillatus* indicates a novel processing proteinase activity. *Biochem J.* 299 (Pt 2): 431-6.
51. Skogh, C., Garm, A., Nilsson, D.E., a Ekstrom, P. (2006): Bilaterally symmetrical rhopalial nervous system of the box jellyfish *Tripedalia cystophora*. *J Morphol.* 267: 1391-405.
52. Sopott-Ehlers, B., Kearn, G.C., a Ehlers, U. (2001): Evidence for the mitochondrial origin of the eye lenses in embryos of *Entobdella soleae* (Plathelminthes, Monogenea). *Parasitol Res.* 87: 421-7.
53. Spring, J., Yanze, N., Middel, A.M., Stierwald, M., Groger, H., a Schmid, V. (2000): The mesoderm specification factor twist in the life cycle of jellyfish. *Dev Biol.* 228: 363-75.
54. Straehler-Pohl, I., a Jarms, G. (2005): Life cycle of *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cubozoa, Carybdeidae) reveals metamorphosis to be modified strobilation. *Marine Biology.* 11: 1122-31.

55. Su, K.F., Meier, R., Jackson, R.R., Harland, D.P., a Li, D. (2007): Convergent evolution of eye ultrastructure and divergent evolution of vision-mediated predatory behaviour in jumping spiders. *J Evol Biol.* 20: 1478-89.
56. Suga, H., Schmid, V., a Gehring, W.J. (2008): Evolution and functional diversity of jellyfish opsins. *Curr Biol.* 18: 51-5.
57. Sweeney, A.M., Des Marais, D.L., Andrew Ban, Y.E., a Johnsen, S. (2007): Evolution of graded refractive index in squid lenses. *J R Soc Interface.*
58. Terakita, A. (2005): The opsins. *Genome Biol.* 6: 213.
59. Tomarev, S.I., Duncan, M.K., Roth, H.J., Cvekl, A., a Piatigorsky, J. (1994): Convergent evolution of crystallin gene regulation in squid and chicken: the AP-1/ARE connection. *J Mol Evol.* 39: 134-43.
60. Tomarev, S.I., Chung, S., a Piatigorsky, J. (1995): Glutathione S-transferase and S-crystallins of cephalopods: evolution from active enzyme to lens-refractive proteins. *J Mol Evol.* 41: 1048-56.
61. Tomarev, S.I., a Piatigorsky, J. (1996): Lens crystallins of invertebrates--diversity and recruitment from detoxification enzymes and novel proteins. *Eur J Biochem.* 235: 449-65.
62. Vaccaro, A.M., Salvioli, R., Tatti, M., a Ciaffoni, F. (1999): Saposins and their interaction with lipids. *Neurochem Res.* 24: 307-14.
63. Werner, B., Cutress, C.E., a Studebaker, J.P. (1971): Life cycle of *Tripedalia cystophora* Conant (Cubomedusae). *Nature.* 232: 582-3.
64. Williams, D.S., a McIntyre, P. (1980): The principal eye of a jumping spider have a telephoto component. *Nature.* 288: 578-580.
65. Zimek, A., a Weber, K. (2008): In contrast to the nematode and fruit fly all 9 intron positions of the sea anemone lamin gene are conserved in human lamin genes. *Eur J Cell Biol.* 87: 305-9.

## 11. Přílohy

**A** Jonasova, K., a Kozmik, Z. (2008): Eye evolution: lens and cornea as an upgrade of animal visual system. *Sem Dev Biol.* 19: 71-81

**B** Kozmik, Z., Ruzickova, J., Jonasova, J., Matsumoto, Y., Vopalensky, P., Kozmikova, I., Strnad, H., Kawamura, S., Piatigorsky, J., Vlcek, C., Paces, V. (2008): Assembly of the Cnidarian Camera-type Eye from Vertebrate-like Components. *PNAS* – přijato do tisku (abstrakt)

**C** Kozmik, Z., Swamynathan, S. K., Ruzickova, J., Jonasova, K., Paces, V., Vlcek, C., Piatigorsky, J. (2008): Cubozoan crystallins: evidence for convergent evolution of pax regulatory sequences. *Evol Dev.* 10: 52-61