

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie**

***Tripedalia cystophora* - modelový organizmus pro studium
evoluce očí**

Kristýna Jonášová

**Bakalářská práce
Praha, duben 2006**

1. Abstract

The evolution of eyes remains a controversial topic. Enormous morphological diversity in addition to the different embryological origins of various types of eyes suggests that eye arose independently multiple times during evolution. On the other hand the existence of common underlying genetic mechanism points to monophyletic origin of eyes.

The aim of this work is to present jellyfish *Tripedalia cystophora* (*T.c.*) as a useful model organism for studies of eye evolution. *T.c.* is the most basal organism which develops complex eyes similar to human eyes containing lens, retina and cornea. Together with the presence of simple ocelli in larval stadium (the simplest eye found in Metazoans) *T.c.* is a unique animal which shares components of visual systems with vertebrates as well as with invertebrates. We focus our interests on *T.c.* optic system and underlying genetic mechanisms. We present recent knowledge from *Tripedalia* morphology and behavior understanding of which is essential for investigations of *T.c.* visual system. We then discuss genes involved in developmental regulation of eyes (especially Pax genes), photoreceptor diversity, and finally crystallins (major lens proteins) in relation to gene sharing evolutionary strategy.

We conclude that *T.c.* components of visual system and its developmental regulation pathways are very ancient in accordance with the basal position of Cnidaria. This makes *Tripedalia* a very suitable model organism to understand eye evolution.

2. Obsah

1. Abstract.....	2
2. Obsah.....	3
3. Zkratky.....	4
4. Úvod.....	5
5. Současné poznatky.....	6
5.1 <i>Tripedalia cystophora</i> , žahavec třídy <i>Cubozoa</i>	6
5.1.1 Taxonomie.....	6
5.1.2 Životní cyklus.....	7
5.1.3 Larvální stádium - planula.....	7
5.1.4 Polypové stádium.....	11
5.1.5 Stádium medúzy.....	11
5.2 Rhopaliium.....	16
5.2.1 Struktura a funkce rhopalia.....	16
5.2.2 Struktura jednotlivých očí a vlastní optika.....	18
5.2.3 Nervová soustava rhopalia.....	20
5.3 Genové zázemí <i>Tripedalia cystophora</i> ve vztahu k regulaci vývoje senzorických orgánů.....	22
5.3.1 Komplexita genomu žahavců.....	22
5.3.2 Pax geny.....	24
5.3.2.1 Charakteristika rodiny Pax.....	24
5.3.2.2 Otázka evoluce Pax genů a vývoje očí.....	25
5.3.2.3 <i>Tripedalia cystophora</i> PaxB.....	28
5.3.3 Majoritní proteiny čočky – krystaliny.....	31
5.3.3.1 Charakteristika krystalinů.....	31
5.3.3.2 Krystaliny organismu <i>Tripedalia cystophora</i>	33
5.3.4 Fotoreceptorové proteiny – opsiny.....	37
5.3.4.1 Charakteristika opsinů.....	37
5.3.4.2 Opsiny organismu <i>Tripedalia cystophora</i>	40
6. Závěr.....	43
7. Seznam citované literatury.....	44

3. Zkratky

CNS – centrální nervová soustava

DOČ – dolní oko s čočkou

Dpp – decapentaplegic

ECM – *extra cellular mass* – nebuněčná hmota vně buněk

EST – *expressed sequence tag* – sekvence s expresní adresou

HD – homeodoména

HOČ – horní oko s čočkou

PD – párová doména

PRC – *photoreceptor cell* – fotoreceptorová buňka

T.c. – *Tripedalia cystophora*

4. Úvod

Evoluce očí je předmětem intenzivního studia a debat od dob Darwina. Porovnání morfologie jednotlivých typů očí a typů fotoreceptorových buněk vedlo k názoru, že oči se v evoluci vyvinuly několikrát nezávisle na sobě. Na druhou stranu, takzvaná molekulární svědectví v podobě sdílení Pax genů coby hlavních kontrolních genů vývoje očí napříč celou živočišnou říší ukazuje i na možnost, že oči se vyvinuly z určitého prapředka. Tento prapředek, jakési "praoko" by bylo sestaveno z komponent, ze kterých by se vyvinuly všechny dnešní typy očí.

Věřím, že je na místě domnívat se, že intenzivní studium molekulární podstaty jednotlivých očních buněčných typů a jejich regulací v nejrůznějších organizmech nám nakonec umožní zrekonstruovat evoluční historii a rozhodnout zda je správná polyfyletická či monofyletické teorie původu očí.

Tripedalia cystophora (čtyřhranka trojitá), člen bazální skupiny organizmů, žahavců, je jedním z těch organizmů, které bychom ve snaze najít odpověď na otázku původu očí měli intenzivně studovat, koneckonců jaký organizmus nám může přinést cennější informace o vývoji očí, než nejprimitivnější živočich vyvíjející komplexní oko a zároveň živočich, který v larválním stádiu vyvíjí u mnohobuněčných doposud popsané nejprimitivnější jednobuněčné oko.

Tato práce by měla představit čtyřhranku, žahavce třídy *Cubozoa* jako modelový organizmus pro studium evoluce očí a pro studium mechanismů spojených s fotosenzitivními funkcemi a jejich regulací.

5. Současné poznatky

5.1 *Tripedalia cystophora*, žahavec třídy *Cubozoa*

5.1.1 Taxonomie

Tripedalia cystophora (*T.c.*) patří mezi *Cnidaria* (žahavce) třídy *Cubozoa* (čtyřhranky, kubomedúzy), v roce 1897 ji jako první popsal F. S. Conant. Jak český název napovídá, jedná se o živočichy čtyřhranného tvaru, zvon těchto medúz není kruhovitý, ale tvoří jej čtyři stěny stýkající se v hranách z jejichž dolního okraje pak vyrůstají z pedalia (výrazné plátky na bázi chapadel u tř. *Cubozoa*) pokračující v chapadla. *Tripedalia* je však zástupcem s méně znatelným čtyřhranným tvarem těla, zvon je spíše kruhový a tušené hrany oblé. Celou třídu lze charakterizovat jako neaktivnější skupinu žahavců, aktivně loví kořist a jsou k rychlému pohybu morfologicky přizpůsobení. Nejdokonaleji ze všech žahavců mají vyvinuté senzorické orgány v komplexech zvaných rhopalia (viz. dále).

Fylogenetika žahavců, ostatně jako i jiných skupin, se podstatně změnila s nástupem molekulárních metod taxonomie a tak na tomto místě připomeneme, že v současné době se kmen žahavci dělí na třídy *Hydrozoa*, *Cubozoa*, *Scyphozoa* a *Anthozoa*, přičemž poslední jmenovaná je pokládána s velkou pravděpodobností za bazální (nikoli nejvíce odvozenou, jak tomu bylo dříve). Za bazální je tato třída označována na základě přítomnosti kruhového mitochondriálního genomu, typického pro zbytek živočišné říše a na základě analýzy sekvencí 18S ribozomální DNA (rDNA), mitochondriálních sekvencí 16S rDNA (Bridge *et al.* 1992 a 1995). *Cubozoa* naopak patří mezi pokročilejší skupiny kmene žahavců. V rámci třídy *Cubozoa T.c.* řadíme do řádu *Cubomedusae* a rodiny *Carybdeidae*.

Cubozoa

Cubomedusae

Carybdeidae

Carukia

Carybdea

Tripedalia

unclassified Carybdeidae

Chirodropidae

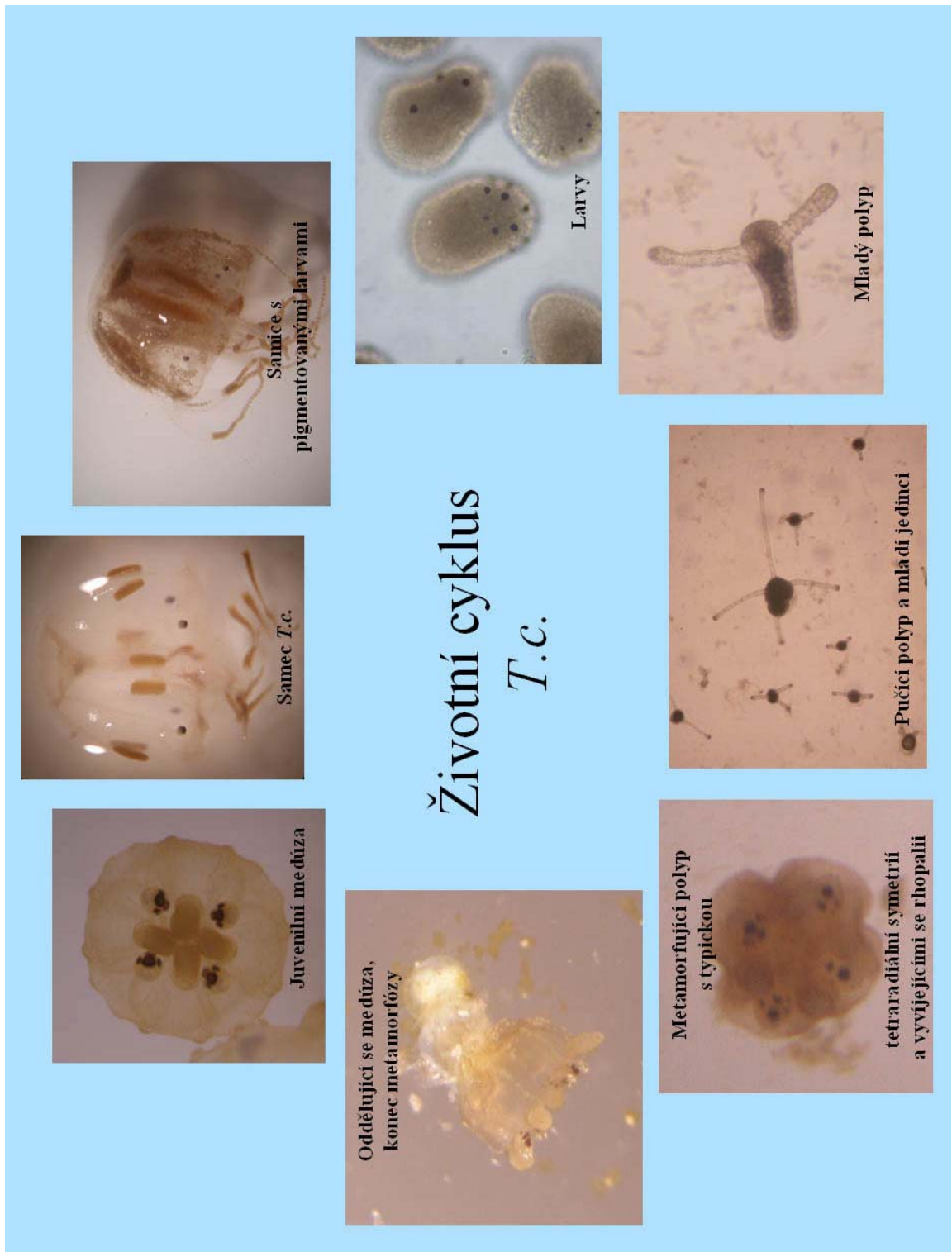
Chironex

5.1.2 Životní cyklus

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. Medúza je u *T.c.* stádium sexuálně se rozmnožující. *T.c.* má oddělená pohlaví a je sexuálně dimorfní. Samci jsou zpravidla menší než samice, gonády jsou uloženy v lištách pomyslných hran zvonu a jsou mnohem užší než samičí, které se plní opaleskujícími vajíčky vyplňujícími později značnou část těla samice. Morfologické rozdíly nalezneme i ve tvaru chapadel. Oplodnění je vnitřní, samec pravděpodobně samici předá sbalené spermie v podobě spermatoforu, následně jsou jimi oplodněná vajíčka ukrytá v samičích tělních dutinách. Z těch se vyvíjejí nejprve nepigmentované a nepohyblivé larvy, kterým se později na posteriorní části těla vyvíjejí *ocelli* (jednobuněčné jednoduché oči) a které jsou schopné aktivního pohybu. Samice, která během tohoto vývoje nepřijímá potravu umírá záhy po vypuštění larev manumbriem (Werner, 1971). Vypuštěné larvy přisedají k podkladu a metamorfuji v polypové stadium. Ocelli migrují z posteriorního konce dovnitř larvy a za den až dva vypučí první dvě chapadla, následně další a vyvíjí se polypové stadium, pro které je charakteristické vegetativní rozmnožování. Od mateřského jedince se při bázi těla těsně nad peridermem (obal, vylučovaný ektodermem, ve kterém polyp doslova sedí) oddělují a dorůstají noví polypi. Ve vhodných podmínkách se vegetativní polyp mění v polypa metamorfujícího, odlišitelného výraznou tetraradiální symetrií těla, který během několika dnů vyvine takové struktury, jakými jsou rhopalia (složitě komplexní oči) a který se nakonec mění v juvenilní medúzu. Metamorfóza je kompletní a obdobná metamorfóze popsané u kubomedúzy *Carybdea marsupialis* (Straehler-Pohl a Jarms, 2005).

5.1.3 Larvální stádium - planula

Po oplodnění vajíčka a několika děleních se vyvíjí zploštěná blastula. Horní a dolní ektoderm se odděluje (centruje) a po gastrulaci se ustavuje druhý zárodečný list, endoderm. Vyvíjí se velmi jednoduchá larva. Podrobíme-li larvu ji morfologické studii s využitím elektronové mikroskopie, tak jako učinil Nordström a jeho kolegové, nalezneme celkem pět typů buněk. Povrch larvy tvoří monociliární epitelové buňky mezi které se zřídka vmezeřují nematocyty (žahavé buňky). Dále nalezneme dva různé typy vnitřních

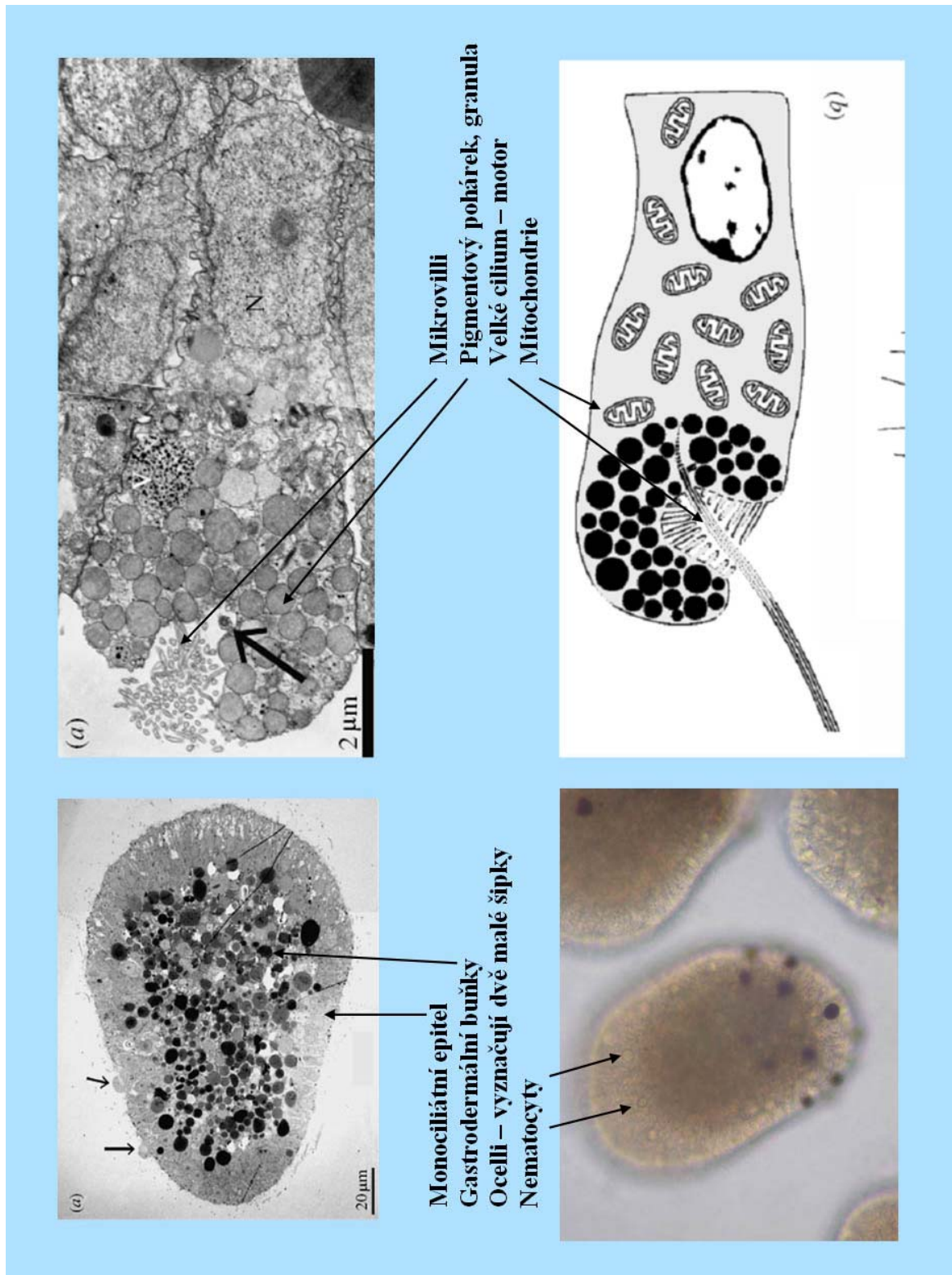


Obr.1: Životní cyklus čtyřhranky *Tripedalia cystophora*.

gastrodermálních (=endodermálních) buněk: světlejší na ribozomy bohatší typ a druhý tmavší typ plný elektrodensních granulí. Tyto granule představují tukovou zásobu a zajišťující larvě kromě výživy i vznášivost. Pátým typem jsou unikátní světločivné buňky (*ocelli*) na posteriorním konci larvy. Nenalezneme tedy žádné nervové buňky a to ani u jiných zástupců z třídy *Cubozoa*. V porovnání s larvami ostatních žahavců, které kromě nervové soustavy disponují i mnoha typy buněk, se jednoduchost třídy *Cubozoa* jeví jako zajímavý fakt a možný redukovaný stav.

Volně plovoucí larva se objevuje po 24-72 hodinách. Následně přisedá a mění se v polypa s jednoduchou stavbou těla (Werner *et al.*, 1971). Larva *T.c.*, planula, je stádium přizpůsobené k vyhledání vhodného místa k přisednutí a budoucí přeměně na polypa. Takovým místem je dno či kořenový systém mangrovíků, tedy oblast charakterizovaná nižší světelnou intenzitou. Proto má larva na posteriorním konci vyvinuté světločivné buňky (*ocelli*), díky kterým je larva schopná reagovat negativně fototakticky na světlo (Nordström *et al.*, 2003). *Ocelli* larvy *T.c.* byly popsány jako prozatím nejjednodušší nalezený systém detekující světlo u mnohobuněčných (Nordström, 2003). Jedná se o komplex fotoreceptoru, stínícího pigmentu a motoru v jedné buňce. Zachytí-li tento orgán dostatečný počet fotonů, indukční kaskáda rozběhne motor v podobě bičíku (*cilia*), který tlačí larvu směrem od zdroje světla, tedy směrem ke dnu. Zmiňované *ocelli* se vyskytují u *T.c.* v počtu 10-15 buněk na posteriorní části těla avšak mezi jednotlivými druhy čtyřhranek (*Cubozoa*) se jejich lokalizace liší (Werner *et al.*, 1971).

Ocellus larev *Tripedalia* je složen z jediné fotoreceptivní buňky a je podobný okolním epiteliálním buňkám. Každá fotoreceptorová buňka obsahuje lyzozómu podobný váček lokalizovaný poblíž jádra; přední polovinu buňky vyplňuje pigmentový pohárek složený z pigmentových granulí se stínícím pigmentem. Pigmentový pohárek je otevřený do prostředí a vyplněn mikrokly (*mikrovilli*), které vybíhají ze všech jeho stran a jsou sídlem vlastní fotorecepce, z vnitřku pigmentového pohárku pak vybíhá jediné *cilium* fungující jako motor tlačící larvu dále od zdroje záření. Ultrastrukturální studie odhalila, že mikrokly protrudující do jamky pigmentového pohárku svou morfologií odpovídají fotoreceptorům rhabdomerického typu (Nordström *et al.* 2003).



Obr.2: Levé fotografie představují morfologii larvy (planuly) *T.c.* a jejich pět typů buněk. Pravá fotografie a náčrt pak představují strukturu *ocellu* larvy, na světelné fotografii v podobě pigmentových skvrn. Elektronmikroskopické fotografie a náčrt *ocellu* byly převzaty z (Nilsson *et al.*, 2005).

5.1.4 Polypové stádium

Plovoucí larva po dvou až třech dnech přisedá a mění se v polypa. Tento polyp dosahuje velikosti kolem 0,5-1 mm, žije přisedle na dně či kořenech mangovníků a loví pomocí vějíře chapadel nahloučených kolem orálního otvoru drobné larvy korýšů. Polypi se vegetativně množí pučením lokalizovaným u báze (terče) polypa. Ve vhodných podmínkách dostatečně velcí polypi metamorfují během několika dní v juvenilní medúzy. Metamorfóza od prvních změn u polypa až po uvolnění medúzy trvá přibližně deset dnů a je kompletní (je přeměněn celý polyp). Vedle nebuněčného obalu po polypovi nezřídka zůstává zmíněný vegetativní klon, který opět za čas podstoupí metamorfózu a bude také schopen vegetativního rozmnožování.

Morfologie polypa *T.c.* není dostatečně zpracovaná, proto nebudeme zmiňovat mnoho morfologických podrobností. Polyp přisedá na substrát terčem v jehož okolí je ektodermem vylučován nebuněčný obal – periderm. Jeho tělní stěna je tvořena ektodermem (vnější část) a endodermem, ze kterého je odvozen gastrodermis vystýlající láčku (gastrovaskulární dutinu). Mezi ektodermem a endodermem se nachází od ektodermu odvozená nebuněčná vrstva – mezoglea. Jediným otvorem spojujícím gastrodermální dutinu s okolním prostředím je orální otvor nacházející se mezi věncem chapadel, kterým je lovena potrava. Potrava je přijímána a zpracována s využitím hladkého svalstva.

Disk (terč) a orální otvor tvoří pomyslné konce jediné osy (radiální) symetrie, kterou popisujeme jako oral - aboral. U polypa nenacházíme sofistikované útvary jakými jsou u medúzy rhopalia, předpokládáme však, že je schopen fotorecepce celým povrchem těla.

Pokud polyp plně dospěje a nachází-li se v optimálních podmínkách, začne se měnit v medúzu. Tato metamorfóza trvá přibližně deset dní a vyvíjejí se během ní i rhopalia, komplexy očí. Ty vznikají již na metamorfujícím polypu nejprve v podobě pigmentových teček na ztluštěninách vzniklých spojováním a retrahováním chapadel. Šest teček na každé ztluštěnině představuje později se vyvíjejících se šest očí jednoho rhopalia. Dvě největší z nich se vyvíjejí v komplexní oko s čočkou.

5.1.5 Stádium medúzy

Medúza je nejkompexnějším a převládajícím stádiem vznikajícím metamorfózou polypů v optimálních podmínkách. Je charakterická přítomností čtyř složených fotosenzitivních orgánů, rhopalií, kde kromě jednoduchých pigmentových pohárků

nalezneme i komplexní oči s čočkou. V dospělosti nacházíme jedince o průměru maximálně 1,5 cm, přičemž samice bývají větší než samci. Nově metamorfovaní polypi, tedy juvenilní medúzy mají průměr zvonu 1 – 2 mm a v některých znacích se ještě odlišují od dospělců. Jsou to především nevyvinutá chapadla, která se časem zmnoží a téměř chybí i ostrůvky nematocytů na zvonu. I rhopalia se do jisté míry liší mezi juvenilními a dospělými jedinci, i když základní komponenty jsou vyvinuty už u obou stádií.

Medúza *T.c.* na rozdíl od jiných zástupců třídy *Cubozoa* nemá výrazný čtyřhranný tvar, ale stejně jako ostatní čtyřhranky má v prostředcích pomyslných stěn zavěšená rhopalia, výjimečné komplexy vizuálních orgánů. U žádného podobně jednoduchého tvora nenajdeme tak složité oko jaké je přítomné v rhopaliu u čtyřhranek.

Tvar zvonu *T.c.* je kubický s oblými hranami (rozlišujeme čtyři kvadranty) a výška zvonu větších jedinců dosahuje osmi až devíti milimetrů, šířka tento rozměr může mírně překračovat. Manumbrium (proboscit, orální otvor) se čtyřmi orálními laloky je zavěšen v dutině zvonu a dosahuje zhruba do jeho poloviční hloubky. Phacelli (filamenta na vnitřní straně trávicí dutiny, součást gastrodermu) jsou kartáčovitého tvaru a po 7 až 13 ústí vždy v jednom kvadrantu z jediného provazce. V každém kvadrantu se nachází rhopalium, které je zavěšeno v sensorické dutině nad kterou probíhá kruhový nervový provazec. Gastrovaskulární dutina je prezentována “žaludkem” - rozšířeninou za manumbriem a šesti jednoduchými základními kanály v každém kvadrantu. Menší kanály ústí i do samotných rhopalií a chapadel.

Svalovinové velarium (plachetka) zmenšuje průměr zvonu v jeho základu o jednu pětinu, zlepšuje efektivitu vypuzování vody a zrychluje pohyb medúzy. Pedalia (horní část chapadel) jsou mírně zploštělá a maximálně poloviční délky výšky zvonu, z každého pedalia pokračuje jediná tentakle o maximálně dvou a půl násobné délce pedalia. Pohlaví je oddělené a gonády umístěné po dvojicích podél pomyslných hran mezi kvadranty, jsou lehce žluto - hnědavě zbarvené. Oplozená vajíčka se vyvíjejí nejprve v gonádách odkud se dostávají do gastrických váčků a kanálů, kde dál pokračují ve vývoji až do stádia volně plovoucí larvy (Conant, 1897).

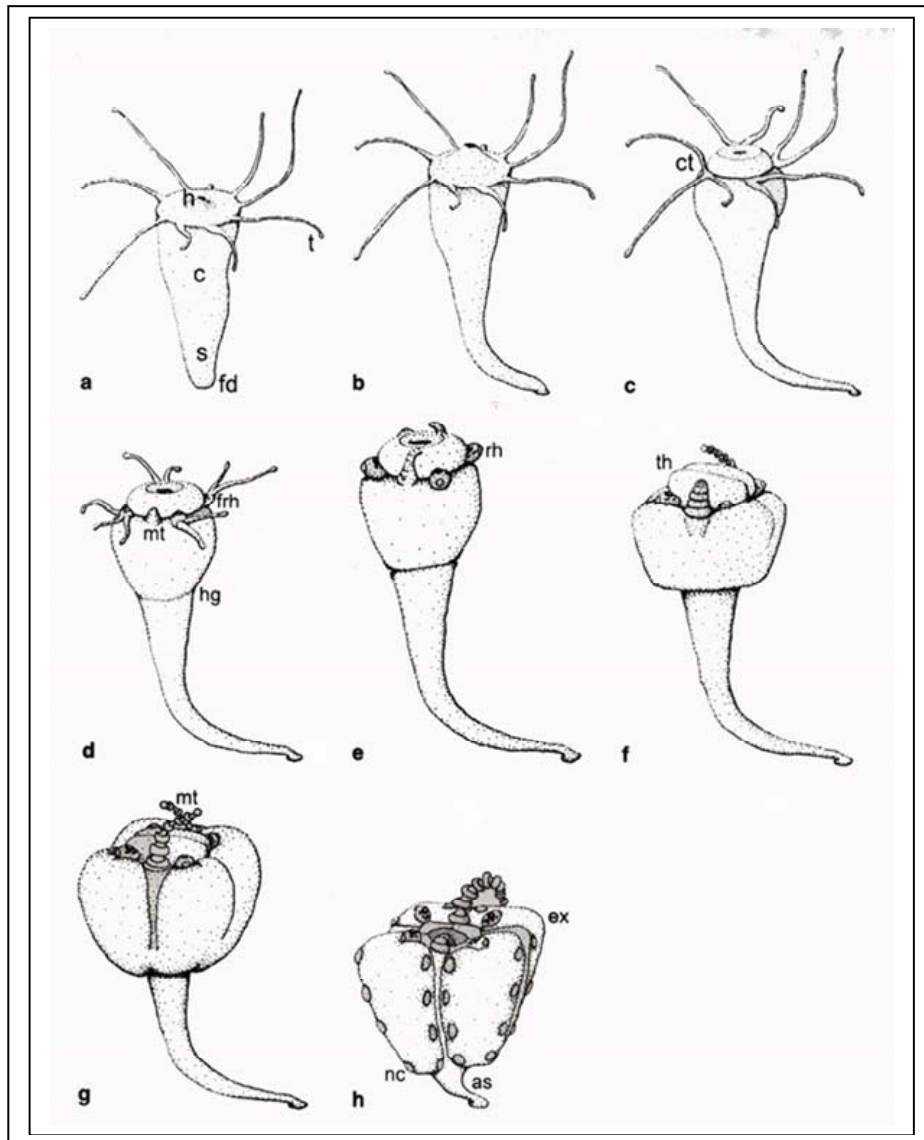
Jak již bylo zmíněno, kubomedúzy jsou nejaktivnějšími žahavci, jsou to rychlí plavci a dobří lovci. Mají vyvinutou svalovinu obdobnou příčně pruhované i svalovinu hladkou, znaky typické pro triblastika. Na rozdíl od nich nemají pravý mezoderm, ze kterého se u triblastik svaly převážně vyvíjejí. Žahavčí svalovina je derivátem entokodonu, který je ektodermálního i endodermálního původu, nicméně je jak od ekto- tak od endodermu oddělen extracelulární matrix (ECM) a může být chápán jako třetí (mezodermu

podobná) zárodečná vrstva. Tato zdánlivá triblasticita některých žahavců je předmětem mnoha současných studií a vede dokonce úvahám o žahavčí diblasticitě, coby redukované triblasticitě.

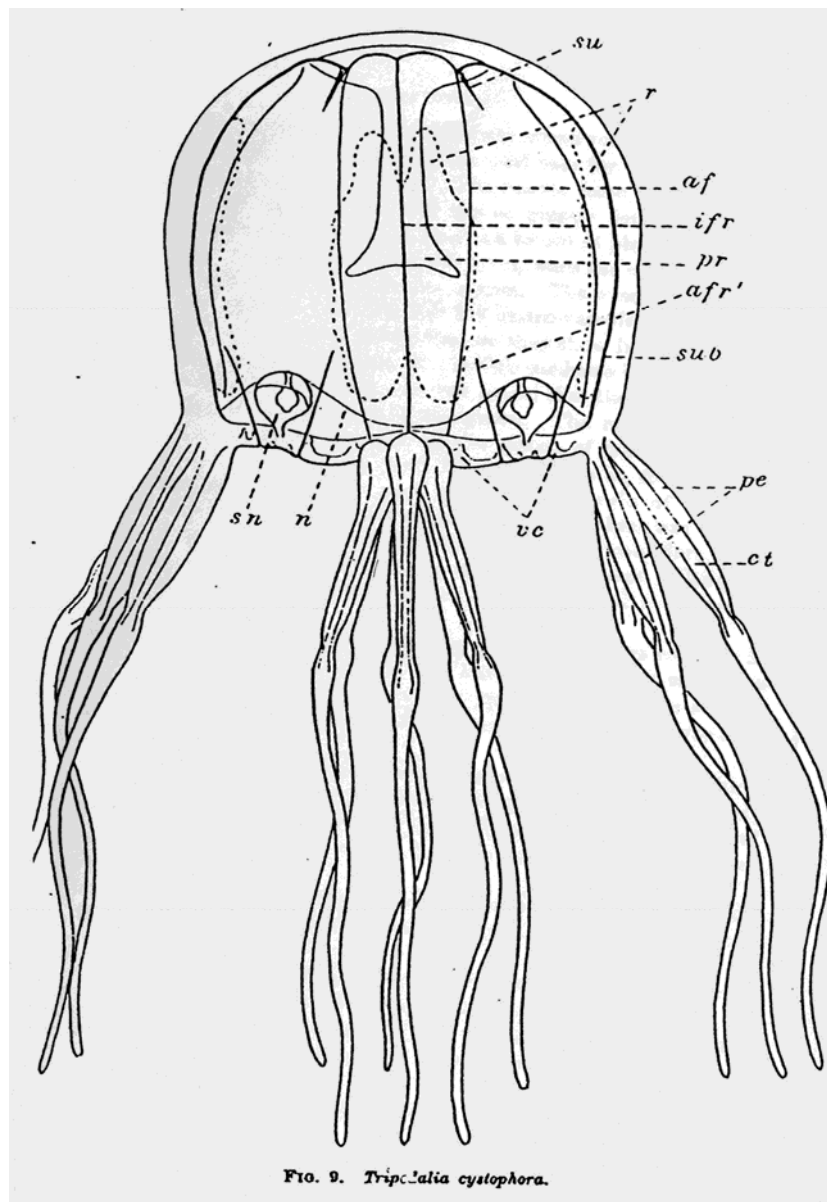
Zvon *T.c.* je lemován vrstvou kruhové, pruhované svaloviny, vrstva pokračuje ve velariu. Periradiální pruhy hladké svaloviny vybíhají radiálně nad úroveň rhopalií do manumbria a orálních laloků. Muskulatura chapadel a pedalií je podélná a omezená na orální stranu pedalia. Svalovina pedalií je spojena s hladkou svalovinou, která vybíhá cirkulárně ze základů chapadel do zvonu. Uspořádání pruhované svaloviny ve frenulách (příčné spoje velaria se zvonem) naznačují využití pro modelaci velaria během zatáčení (Satterlie *et al.*, 2005).

Cubozoa jsou rychlí plavci, schopní prudce změnit směr jako odpověď na fotický či dokonce vizuální vjem. K tomu ovšem potřebují nervovou soustavu, schopnou integrace těchto vjemů a odpovědí. Struktura nervové soustavy je odlišná od struktury ostatních tříd žahavců díky poměrně složitému nervovému systému rhopalií. Skládá se z jemné nervové sítě a nervového provazce kolem zvonu, na který je napojeno nervstvo rhopalií. Důležitou strukturou této CNS jsou i pedaliová ganglia (Parkefelt *et al.*, 2005). Rhopalia jsou důležitými centry této centrální nervové soustavy (CNS) a sídla tzv. *pacemakerů* odpovědných za vzbuzování signálů vedoucích ke stahování zvonu a tedy plavání (Coates, 2003).

Ještě překvapivější než poměrně dobře vyvinutá CNS tohoto diploblastického tvora je bilaterita této CNS. Nervový systém rhopalií tvoří šest párů nervových jader (skupiny neuronů s podobnou morfologií) asociovaných s vizuálními komponenty (jednotlivými oky) a zadní stěnou rhopalia. Navzájem jsou nervová jádra dvou bilaterálně symetrických stran spojována komisurami (Parkefelt *et al.*, 2005).



Obr. 3: Metamorfóza kubomedúzy *Carybdea alata* (na perokresbě) je obdobná metamorfóze *T.c.* Stejně jako v tomto v případě se začne hypostome (h) zvedat (stádium b) a chapadla (t) se začnou shlukovat (stádium c) a u báze splývají ve čtyři zduřeniny (frh), ze kterých se vyvíjejí rhopalia (rh). Objevuje se zjevná tetaradiální symetrie a mezi rhopalií vyrůstají nová chapadla s kruhovitou strukturou (stádium f). Orální část polypa se postupně mění ve zvon medúzy a stopka retrahuje. V závěru metamorfózy se uvolní nová medúza. Převzato z (Strehler-Pohl a Jarms, 2005).



Obr. 4: Morfologie medúzy *Tripedalia cystophora*. *su*, suspensorium; *af*, vnitřní kanál; *r*, gonády; *ifr*, interradiální vnější kanál; *pr*, proboscis (manubrium); *afr'*, vnější kanál; *sub*, subumbrella (zvon); *pe*, pedalium; *et*, chapadla; *vc*, kanály velaria; *n*, kruhový nervový provazec; *sn*, sensorická dutina.

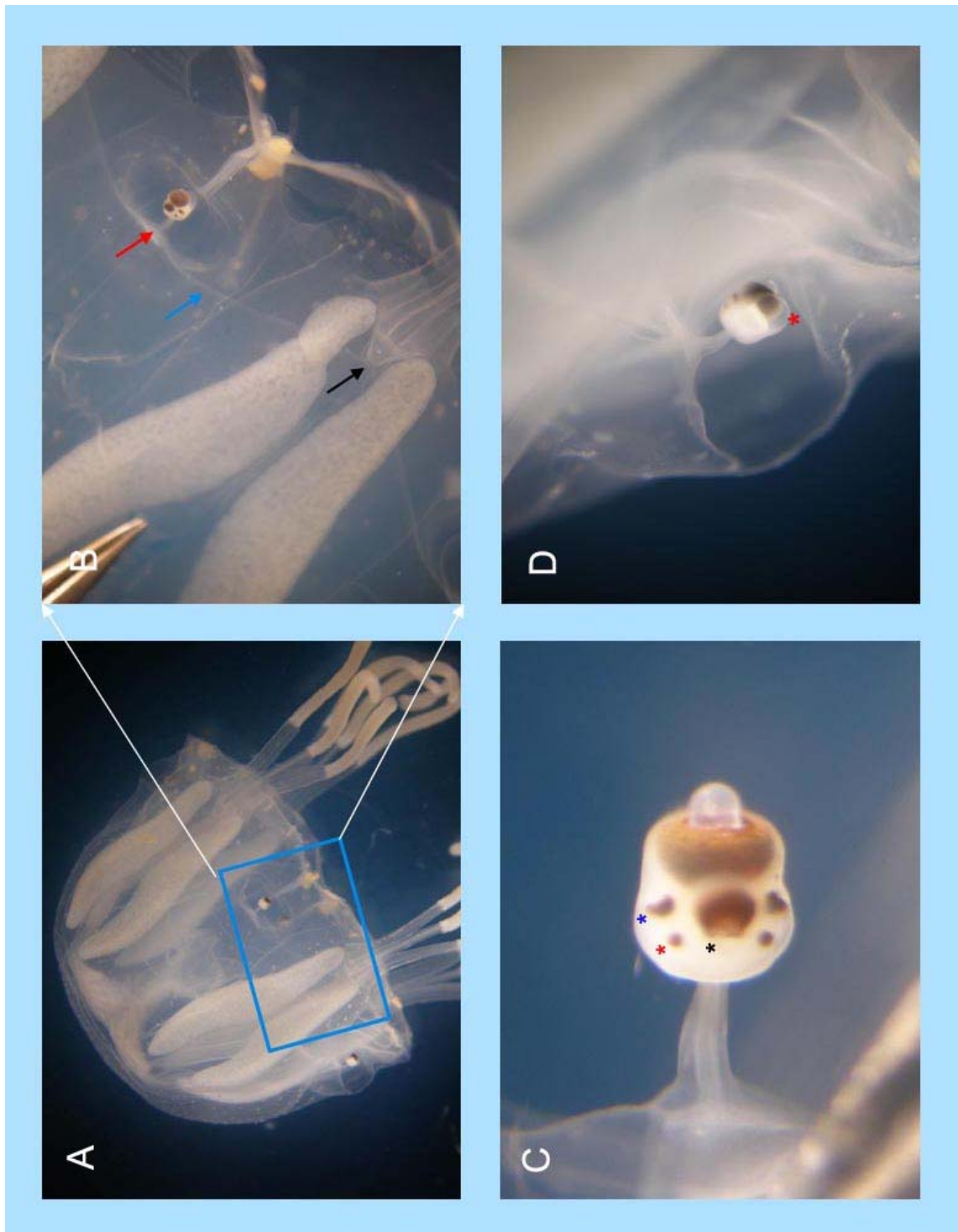
5.2 Rhopaliaum

5.2.1 Struktura a funkce rhopalia

V každé ze čtyř stěn zvonu popisované medúzy se nachází jedno rhopaliaum, komplex senzoričských orgánů zavěšený v senzoričské dutině. Tato rhopalia jsou oblého tvaru a se zvonem spojena kmenem (jsou zavěšena), kterým prochází vedení jak nervové tak gastrovaskulární soustavy. Každé rhopaliaum je přitom složeno ze dvou *pitů* (jamkovité oko), dvou *slitů* (štěrbinovité oko), malého horního oka s čočkou (HOČ) a velkého dolního oka s čočkou (DOČ). Uvážíme-li, že každý jedinec nese čtyři rhopalia, má tedy celkem dvacet čtyři orgánů schopných fotorecepce, očí. Součástí rhopalia je i pravděpodobně anorganická konkrece (nebo ECM s inkorporovanými anorganickými sloučeninami) na dolní straně rhopalia, která má nejspíše za úkol udržet rhopaliaum ve správné pozici (Parkefelt, 2005) a funguje tedy trochu jako těžítka; spekuluje se i o případné funkci coby statokinetického ústrojí. Vprostřed rhopalia se nachází gastrovaskulární dutina, někdy chybně popisovaná jako statocysta.

Rhopalia jsou zavěšena na kmeni vycházejícím ze zvonu medúzy, kterým jsou vedeny živiny do gastrovaskulární dutiny rhopalia a kterým je vedeno nervové spojení s nervovým provazcem kolem dolního okraje zvonu. Zavěšena jsou v pozici, kdy malé horní oko s čočkou je orientováno proti zvonu a velké oko s čočkou shlíží dolu, jakoby pod medúzu.

Tripedalia cystophora žije v mangrovových pobřežních porostech teplých karibských vod, kde vyhledává shluky drobných korýšů, kteří se shromažďují v kuželech světla dopadajících skrz listy mangrovníků a prosvětlujících tak jinak poměrně tmavé vody mangrovů. Klíčovou je pro ni tudíž schopnost nalézt tyto světelné kužely k čemuž jí bezesporu slouží světločivné orgány rhopalia. *Tripedalia* se vyznačuje pozitivní fototaxí, která jí k těmto místům navede a kde se jí posléze na tentekle “nalepí” drobní korýši. Navíc prostředí, ve kterém se pohybuje je plné nástrah (kořeny a větve mangrovníků) neustále ohrožujících křehké tělo medúzy, uniknout těmto překážkám (zaznamenat je a vyhnout se jim) je pravděpodobně další funkcí rhopalia (Coates, 2003). Předpokládá se ale, že její sofistikovaný senzoričský systém je schopen i pokročilejších vizuálních vjemů jak ukazují studie optického zázemí (Nilsson, 2005) i nervového systému rhopalia (Parkefelt, 2005; Garm, 2006).



Obr. 5: Pozice a složení rhopalia. A Medúza *T.c.*, modrý výřez odpovídá B. B Červená šipka ukazuje na kmen vedoucí k rhopaliu, modrá na kruhový nervový provazec, černá na pedaliové ganglium. C Rhopalium zavěšené na kmeni, kterým vede nervstvo i kanál gastrodermální soustavy. Modrá hvězdička označuje *slit*, červená *pit*, černá malé horní oko s čočkou. D Rhopalium zavěšené v senzoričné dutině. Červená hvězdička označuje polohu statolitu.

5.2.2 Struktura jednotlivých očí a vlastní optika

Rhopalium představuje aglomeraci třech druhů očí. Především jsou to pozoruhodné a očím vývojově pokročilejších organismů podobné oči s čočkou, retinou, rohovkou a obecně vlastnostmi typickými pro oči, které neregistrují jen intenzitu světla, ale přinášejí i další vizuální informace a to ať jde o barvu, přítomnost objektu či jeho vzdálenost. Dále se v rhopaliu nacházejí dva druhy jednoduchých očí (*ocelli*), tzv. *pit* v podobě pigmentové jamky a tzv. *slit* v podobě pigmentové štěrbiny. Vznikají invaginací povrchového epitelu (Coates, 2003).

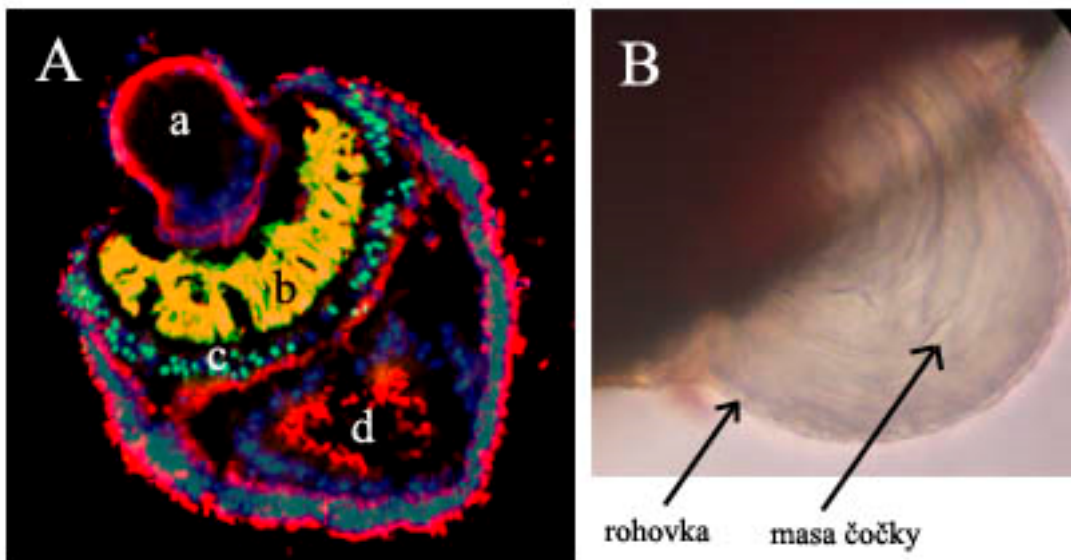
Oči a jejich nervový systém jsou uspořádány v rhopaliu zjevně bilaterálně symetricky a to tak, že midsagitální rovina prochází středem horního malého i dolního velkého oka s čočkou a *pit* a *slit* jsou umístěny po stranách těchto očí, vždy po jednom na každé straně. *Pit* je blíže malému hornímu oku s čočkou a *slit* blíže dolnímu velkému oku s čočkou (viz. Obr.5).

Oči s čočkou mají široké zorné úhly a průhlednost zvonu pravděpodobně umožňuje i pozorování přes něj (HOČ). *T.c.* má tedy k dispozici téměř panoramatický pohled do svého prostředí. Nejcitlivější jsou fotoreceptory *T.c.* k světlu o vlnové délce odpovídající modré barvě. Což je běžné u vodních organismů, neboť světlo o vlnové délce odpovídající modré barvě prostupuje vodou nejlépe ve srovnání s ostatním viditelným zářením. Navíc *pit*, *slit* a HOČ s DOČ jsou strukturně a funkčně odlišné orgány, které pravděpodobně organismu umožňují zpracování vizuálního vjemu několika způsoby. Studie dokonce poukazují na integraci nervových výstupů ze *slitů* a DOČ a integraci z *pitů* a HOČ, tvořily by tak dvě sensorické skupiny (Parkefelt, 2005).

Unikátní je zmiňovaná struktura dvou komplexních očí s čočkou, kde každé z nich je vybaveno čočkou s gradientem refrakčního indexu (rozložení je odlišné mezi DOČ a HOČ), která umožňuje soustředění obrazu (i když obraz není přímo zaostřen na retinu, ale mírně či více za ní; Nilsson, 2005). Čočka je překryta tenkou rohovkou z podlouhlých buněk. Za čočkou se nachází retina, úzký prostor mezi těmito strukturami je vyplněn amorfní buněčnou hmotou. Retina je tvořena pigmentovými buňkami (vnější část, směrem od čočky) a fotoreceptorovými buňkami (vnitřní část blíže čočce), které se nejspíše mezi sebe vmezeňují, neboť na řezech byl pozorován jen jeden pás jader a to až za pigmentovou vrstvou (tedy nejdále od čočky, K. Jonášová, nepublikované výsledky).

Vlastní fotoreceptory ciliárního typu vybíhají mezi pigmentovými buňkami a vytváří světločivnou vrstvu v bezprostřední blízkosti čočky. Pigmentové buňky vytváří pás tmavého pigmentu melaninu odstiňujícího přebytečné a odrážející se světlo. V přední části

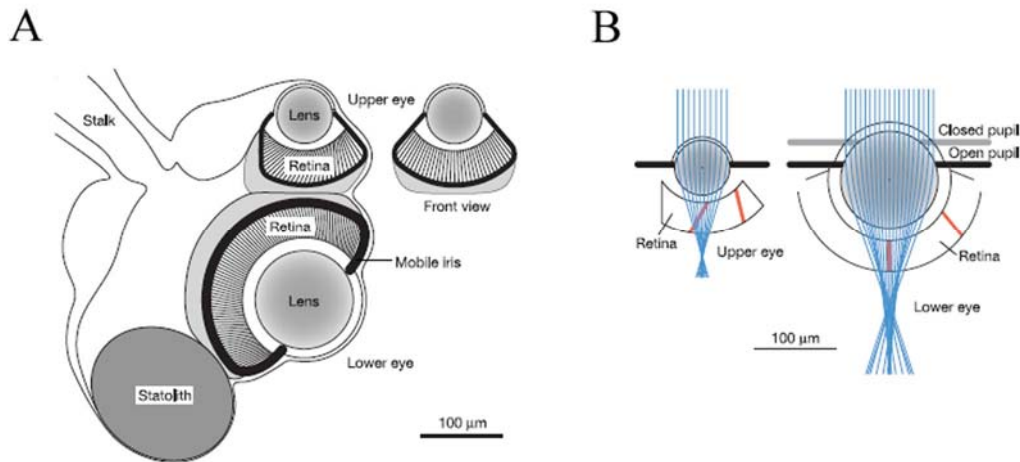
oka pás překrývá vlastní fotoreceptory (v případě DOČ) a tvoří clonu okolo čočky, která je schopná zmenšit průměr otvoru, kterým vstupuje světlo z 150 μ m na 100 μ m během zhruba minuty (Nilsson, 2005).



Obr. 6: A Řez rhopaliem v oblasti velkého oka s čočkou, červeně acetylovaný tubulin, zeleně opsin. (a) čočka; žlutá barva (b) retina; (c) pás jader (zelená a modrá) retinových buněk. Zelená jádra jsou původem z receptorových (opsin obsahujících) buněk, modrá z pigmentových (stínících, melanin syntetizujících) buněk. (d) gastrovaskulární dutina. Modře jsou značená jádra. B Detail řezu čočkou velkého oka. Patrná je vrstevnatá struktura čočky. (K. Jonášová; nepublikované výsledky)

Přítomnost clony není jediným rozdílem mezi malým a velkým komplexním okem. Odlišné je i uspořádání fotoreceptorů v retině a vlastnosti čoček. Znázorňuje schéma níže převzaté z (Nilsson, 2005). Obě čočky lámou světlo odlišným způsobem a to na základě rozdělení indexů lomu (refrakčních indexů). DOČ čočka má v tomto směru homogenní centrum a gradient se vyskytuje jen ve vnější polovině čočky, HOČ má refrakční gradient homogenní v rámci celé čočky. Z toho vyplývají i optické rozdíly; HOČ má gradient blízký ideálnímu stavu a světelné paprsky se sbíhají blízko za retinou, kdežto u DOČ se paprsky sbíhají poměrně daleko za retinou a navíc se objevují sférické poruchy. V ani jednom případě tedy není obraz zaostřován přímo na retině. Výsledně je díky nedokonalým čočkám a neoptimalizovanému tvaru fotoreceptorového pole obraz rozostřen a intenzita zobrazovaného světla u různých skupin fotoreceptorů je dramaticky odlišná. Teorii

specializace každého ze čtyř typů očí přítomných v rhopaliu pak na základě těchto a dalších informací nabízí Nilsson a kolegové.



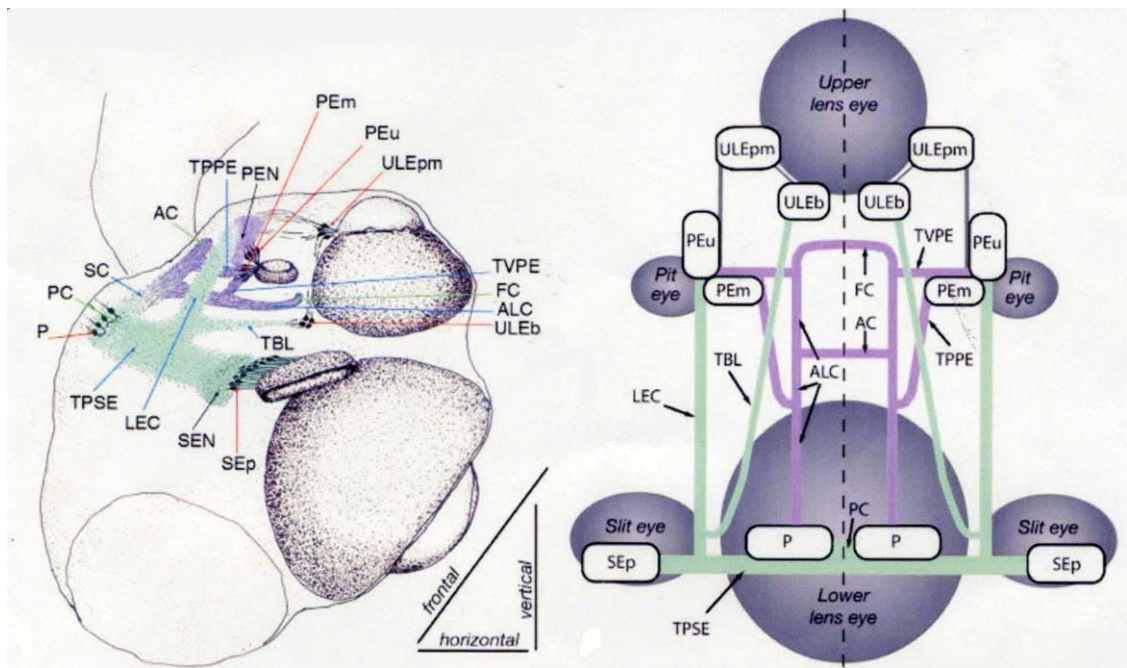
Obr. 7: A Kresba znázorňující složení rhopalia a strukturu retiny na vertikálním řezu v místě kmene (stalk). Zajímavé je rozdílné uspořádání fotoreceptorů v retinách malého a velkého oka s čočkou. B Porovnání zaostřovací schopnosti malého (vlevo) a velkého (vpravo) oka s čočkou, které se od sebe liší nejen velikostí, ale také rozložením refrakčního indexu a schopností přicloužení (velké oko). Modré paprsky znázorňují procházející světlo a jejich střet až za retinou má za následek rozostření obrazu. Převzato z (Nilsson *et al.*, 2005).

5.2.3 Nervová soustava rhopalia

Diskutabilní byl delší dobu význam tak vyspělých struktur bez schopnosti integrace jejich vjemů a následné odpovědi zprostředkované CNS (např. v podobě úhybného manévru před blížícím se kořenem). U medúz je zpravidla nervová soustava reprezentovaná hlavním nervovým provazcem při bázi zvonu a jemnou nervovou sítí, jak platí i u *T.c.* U *T.c.* se nad pedaliemi v místě nervového provazce nachází další ganglia (jedno nad každým pedaliem) 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). Ti popisují 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 protilátky proti PCNA. I tato část nervového systému však dostatečně demonstruje jeho nečekanou složitost.

PCNA – imunoreaktivní (PCNA – ir) neurony se nachází v horní polovině rhopalia a vytváří šest párů bilaterálně symetrických nervových jader spojených třemi komisurami (propojují symetrické strany). Vertikálně jsou spojovány jednotlivá jádra nejméně čtyřmi konektivami na každé straně. Další PCNA – ir nervová vlákna a neuropil se nachází okolo kmene a mezi stropem gastrodermální dutiny (GD) a ektodermem, dále po stranách GD poblíž *pitů*. Tenčí vlákna a difúznější PCNA – ir síť je přítomna po obvodu celé GD a HOČ (Parkefelt, 2005). Toto barvení neodhaluje propojení s nervovým provazcem při bázi zvonu. Nicméně jej doplňuje práce Garmse a kolegů (Garms, 2006), kteří na morfologické úrovni charakterizují nervstvo kmene (včetně jednotlivých synapsí), propojující rhopalium s tzv. rhopaliovým gangliem. Navíc popisují i další nový nerv v kmene s proprioreceptivní funkcí (mechanoreceptorová funkce). Propojení provazce s rhopaliem ukazuje ve své práci i V. J. Martin (Martin, 2003) jako barvení RFamid – pozitivních neuronů procházejících kmenem (neuvádí však dostatečné podrobnosti k barvení). 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 provazcem u báze zvonu. Tato integrace pak zajišťuje možnou odpověď organismu na vizuální vjem, umožňuje ovládání 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).



Obr. 8: Schéma nervové soustavy v rhopalium. Vlevo boční pohled na rhopalium s vyznačenými nervovými jádry (dále jen jádry) a svazky nervových vláken (trakty). Vpravo schematické znázornění nervových jader a propojení mezi nimi při čelním pohledu na rhopalium. Zde je dobře znatelná bilaterální symetrie jednotlivých komponent (osa symetrie je vyznačena přerušovanou čarou). PEm, střední jádro *pitu*; PEu, horní jádro *pitu*; ULEpm, zadostřední jádro horního oka; TVPE, vertikální trakt *pitu*; FC, přední komisura; ALC, apikální podélná konektiva; ULEb, hlavní jádro horního oka; TBL, hlavní podélný trakt; SEp, zadní jádro *slitu*; SEN, neuropil *slitu*; LEC, podélná oční konektiva; TPSE, zadní trakt *pitu*; P, zadní jádro; PC, zadní komisura; SC, kmenová konektiva; AC, přední komisura; TPPE, zadní trakt *pitu*; PEN, neuropil *pitu*. Převzato z (Parkefelt *et al.*, 2005).

5.3 Genové zázemí *Tripedalia cystophora* ve vztahu k regulaci vývoje sensorických orgánů

5.3.1 Komplexita genomu žahavců

Zdánlivě by možná bylo rozumné předpokládat, že primitivní živočich (jakým po morfologické stránce oproti kupříkladu obratlovcům žahavci jsou) bude mít také primitivní a jednoduchý genom, vzdálený tomu našemu. V posledním desetiletí se však stále více ukazuje, že morfologická jednoduchost má jen velmi málo společného se strukturou vlastního genomu a genové regulace. Stává se čím dál tím zřejmějším, 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, 2003), celkově, ale organizmy sdílí překvapující množství genů. A tak nepřekvapí, že i velmi primitivní organizmus jakým je *Trichoplax adherens*, který ještě nevytváří ani plnohodnotné tkáně, nese ve svém genomu gen, který je u pokročilejších organizmů hlavním regulátorem vývoje očí.

Žahavci patří k banálnějším skupinám organizmů, přesto se zdá, že toho s námi mají společného více než tradiční a tzv. pokročilejší modelové organizmy octomilka či háďátka. Genová konzervace od žahavců k obratlovcům je zjevná, ukazují to případy mnoha studovaných genů typických pro procesy známé z pokročilejších organizmů, jako je specifikace mezodermu. Mezoderm specifikuující faktor Twist byl popsán u žahavců a navíc je v klíčové helix – loop – helix oblasti podobnější obratlovčímu než tentýž gen u octomilky (*Drosophila*) či hlístů (*Nematoda*) (Spring *et al.*, 2000). Dalším příkladem mohou být Hox geny definující expresi odlišných kombinací jednotlivé části těla (*anterior – posterior body patterning genes*). Kdy a jak tento komplex genů vznikl objasňují současné poznatky o Hox genech žahavců, které byly charakterizovány a poukazují na starobylý původ celé skupiny a pravděpodobnou divergenci ještě před vznikem bazálních skupin (Ferrier a Holland, 2001). Navíc si žahavci udržely i některé geny, které byly následně v pokročilejších organizmech ztraceny (Galliot a Schmidt, 2002). Taktéž byly u žahavců charakterizovány geny podílející se na formování bilaterální symetrie a tedy specifikaci tělních os (viz. souvislost s bilaterální symetrií rhopalia a jeho CNS; Galliot a Miller, 2000) nebo například komponenty Wnt signální dráhy (Hobmayer *et al.*, 2000).

Nedávno byla publikována práce Kortschaka a kolegů založená na sekvenačním (byla publikována rozsáhlá ESTová knihovna) projektu žahavce, korálu *Acropora millepora* (*A.m.*). Stanovili sekvenci tisícovek genů a ve snaze lépe porozumět evoluci genomů v rámci mnohobuněčných organizmů je porovnali s dostupnými genomy, tedy především lidským, myším, genomem octomilky (*Drosophila melanogaster*) a háďátka (*Caenorhabditis elegans*). Ke svému překvapení zjistili, že mnoho z genů, o kterých se předpokládalo, že jsou obratlovčími novinkami, je zastoupeno právě v genomu *A.m.* Více než 10% ESTů *A.c.* s homologními sekvencemi mezi mnohobuněčnými mělo velmi podobné lidské homology, ale nebylo přítomno v genomech octomilky ani háďátka. Tato kategorie ESTů obsahovala jak transkripční faktory, tak proteiny metabolismu, považované za zmiňované obratlovčí evoluční novinky. V liniích vedoucím k modelovým

organizmům octomilce a háďátka tedy muselo dojít k mnohem větší ztrátě genů než se obecně předpokládalo. Navíc i *A.m.* sekvence se zástupci (homology) jak v lidském genomu tak v genomech octomilky a háďátka vykazovaly větší podobnost právě k obratlovčím sekvencím (Kortschak *et al.*, 2005). I z tohoto hlediska se *Tripedalia cystophora* coby zástupce žahavců jeví jako ideální modelový organizmus.

Nejdéle studovaný žahavec je nezmar (*Hydra*) s genomem o velikosti okolo 1300 Mbp (Zacharias, 2004), což je úctyhodné ve srovnání s naším genomem pohybujícím se kolem 3300 Mbp nebo extrémně malým genomem japonské ryby *Takifugu rubripes* 392 Mbp. Při představě kolik balastní sekvence v našem genomu koexistuje s využívanými geny a regulačními oblastmi a kolik takové balastní sekvence žahavci mít vůbec nemusí, mohlo by se zdát, že toho oproti nám nebo jiným organizmům o mnoho méně mít nemusí. Na druhou stranu velikost genomu není příliš směrodatným ukazatelem, neboť jen v rámci živočichů kolísá druh od druhu až tisíckrát, největší rozdíly mezi velikostmi genomů pak nacházíme mezi *Protisty*, kde je rozdíl mezi jednotlivými druhy až třístatisícinásobný (www.genomesize.com).

5.3.2 Pax geny

5.3.2.1 Charakteristika rodiny Pax

Rodina Pax genů kóduje tkáňově specifické transkripční faktory, jejichž jednotlivé domény jsou silně evolučně konzervovány. Pax geny byly nalezeny u širokého spektra organizmů, žahavce nevyjímaje, přičemž nejpočetnější skupiny byly popsány u obratlovců. Tyto geny řadíme do skupiny homeobox genů, charakterizovaných přítomností DNA vazebné regulační homeodomény (HD). Ta však byla u některých Pax genů sekundárně redukována nebo chybí zcela. Název Pax genů je odvozen od přítomnosti druhé regulační DNA vazebné domény Pax genů, kterou je párová doména (PD), kódovaná v genu párovým boxem (*paired box*). Párová doména reguluje aktivitu dalších genů vazbou na jejich regulační místa (promotory, enhancery) a je složena ze dvou částí: aminoterminální PAI a karboxyterminální RED. Každá z nich rozeznává úsek na komplementárním vlákně (celkový vazebný úsek o délce zhruba 17 bp) (Czerny, 1993). Třetí funkční částí Pax proteinů (je součástí tří ze čtyř skupin Pax genů) je oktapeptid, malý regulační úsek interagující s ostatními proteiny a modulující tak dalším způsobem transkripci (Eberhard *et al.*, 2000).

Z vyšších obratlovců bylo izolováno devět Pax genů označovaných Pax1 až Pax9, ty lze podle strukturní podobnosti a tedy podle přítomnosti jednotlivých domén dělit do čtyř skupin. První skupina zahrnuje Pax geny jejichž proteiny obsahují pouze párovou doménu a oktapeptid (Pax1, Pax9), druhá skupina je pak oproti první charakterizovaná přítomností redukované homeodomény (Pax2, Pax5, Pax8), třetí skupina má všechny tři domény kompletní (Pax3, Pax7) a čtvrté skupině chybí oktapeptid (HD je kompletní) (Pax4, Pax6). Výsledný rozdíl mezi jednotlivými produkty Pax genů však tkví ve specifitě rozeznávané a vázané DNA sekvence a ta je určena především aminokyselinovou sekvencí PAI domény. Například rozdíl mezi vazebnou specifitou Pax2, Pax5, Pax8 (skupina vznikla duplikací původně jednoho genu, který je zachován ještě v kopinatci) a Pax6 spočívá v třech klíčových aminokyselinových pozicích (Czerny a Busslinger, 1995). Pax geny v evoluci prošly opakovanými duplikacemi a zmiňované formy genů jsou následkem divergence jednotlivých paralogů (Balczarek *et al.*, 1997). Otázkou je, což budeme diskutovat později, co stálo na počátku těchto duplikací a jaká tedy byla evoluční cesta Pax genů.

Funkčně jsou Pax geny nepostradatelné pro ontogenezi prakticky každého organismu. Regulují široké spektrum morfologických pochodů, pro ilustraci u obratlovců: Pax6 – vývoj očí, mozku a slinivky, Pax7 – myogeneze, Pax5 – vývoj imunitního systému atd. Pravděpodobně nejvíce zmiňovaným Pax genem byl a je Pax6, který se účastní regulace mnoha genových kaskád. Především byl odhalen jako *universal master control gene of eye morphogenesis* (např. Gehring, 2002) a sdílení tohoto klíčového iniciátora a regulačního člena vývoje očí (a to ať již obratlovčích nebo muších) je pak základem teorie monofyletického původu očí. Avšak jeho univerzálnost a monofyletická teorie je v současné době sporná (viz. další kapitola a Kozmik, 2005). Dnes je velkou výzvou objasnit původ Pax genů, jaká byla jejich evoluční cesta a co vše “mají za sebou” kupříkladu naše Pax geny.

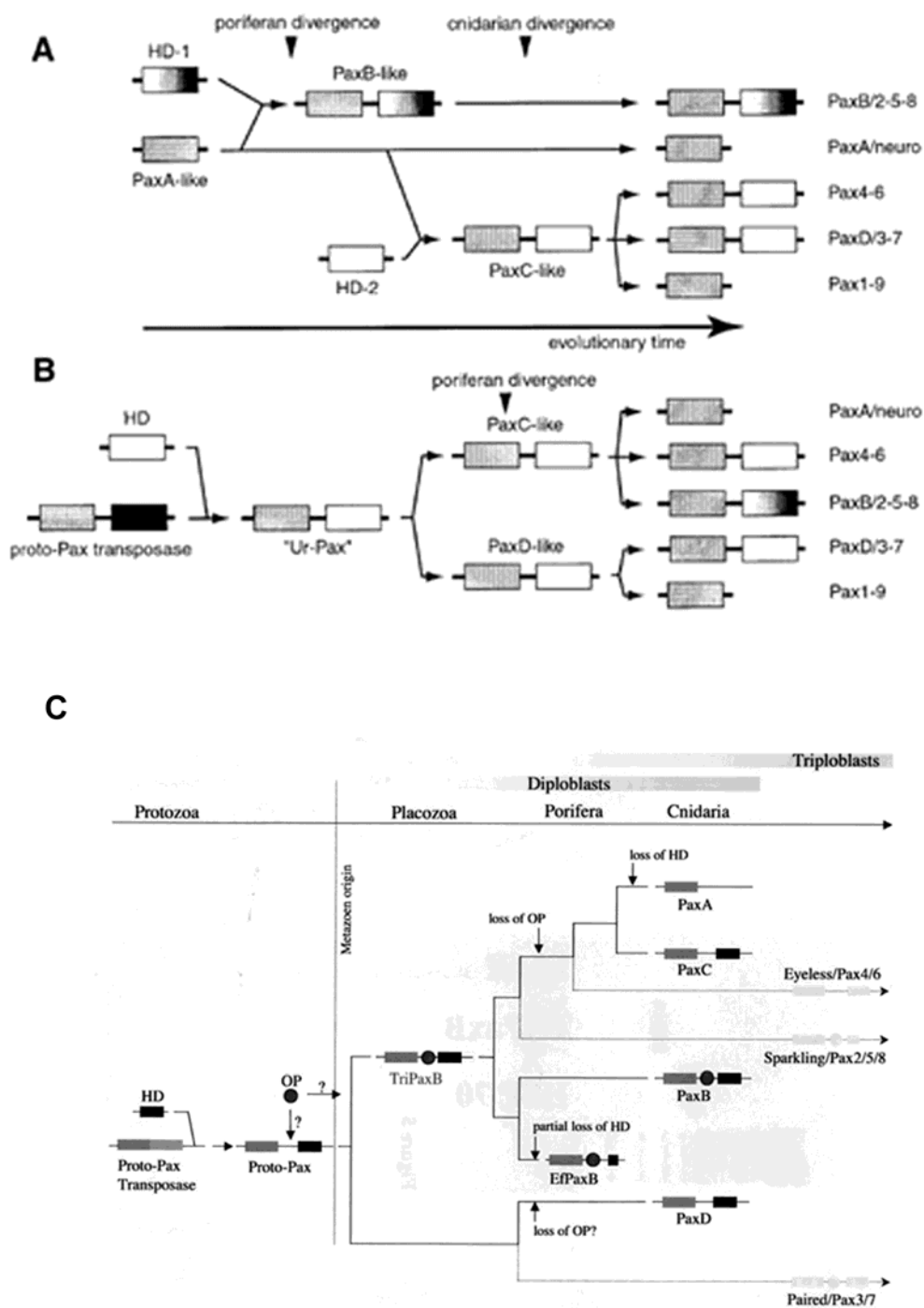
5.3.2.2 Otázka evoluce Pax genů a vývoje očí

Pax geny byly doposud popsány u širokého spektra organismů, v posledních letech byly izolovány i z bazálních skupin organismů: žahavců (PaxA, PaxB, PaxC a PaxD typy), živočišných hub (*Porifera*, PaxB) (Hoshiyama *et al.*, 1998; Larroux *et al.*, 2006) a dokonce vložkovce *Trichoplax adherens* (bazální PaxB) (Hadrys *et al.*, 2005), tedy organismů s absencí nervových a sensorických buněk. Pax geny se tedy objevily ještě před vznikem

nervových soustav či živočišných fotoreceptorů a do role vyšších regulačních členů genových kaskád byly angažovány pro široké spektrum cílových sekvencí a možných interakcí, což je právě následek spolupůsobení nezávislých DNA vazebných domén nebo kooperací mezi vlastními doménami (jak shrnuje Kozmík, 2005). Na základě stále přibývajících poznatků o rodině Pax genů bylo vysloveno mnoho hypotéz o jejich původu. Všechny však vychází z poznatku, že nejkonzervativnější je mezi Pax geny párová doména (zejména PAI) a pokládají ji za základní součást tzv. Proto – Pax genu, která následně podle většiny teorií fúzuje s do té doby nezávislou homeodoménou párového typu. Tento fúzní gen prochází poté podle různých schémat duplikacemi, na úrovni stále ještě bazálních organismů insercí oktapeptidu a následně redukčními událostmi v oblasti homeodomény.

Rozdíly mezi teoriemi jsou především v původu oné zakladatelské párové domény. Breitling a Gerber vyslovily odvážnou teorii o vzniku Proto – Pax fúzí DNA vazebné domény transpozázy (Proto – Pax transpozáza) s homeodoménou krátce po objevení se mnohobuněčnosti. (Breitling a Gerber, 2000) a následně genové duplikaci ještě před oddělením hub (*Porifera*). Vychází přitom z neobvyklé podobnosti N – terminální subdomény PAI s Tc3 transpozázovou DNA vazebnou doménou. Jejich fylogenetické studie jsou však málo průkazné a stromy znázorňující oddělování jednotlivých skupin mají nízkou bootstrapovou podporu. Galliot a Miller navrhuje do role zakladatelské párové domény PaxA – *like* párovou doménu, která by opět fúzovala s homeodoménou a dala tak vzniknout Proto - Pax (Galliot a Miller, 2000; Miller *et al.*, 2000).

Nejucelenější pohled na problematiku má momentálně nejspíše skupina Hadryse, které se podařilo izolovat zmiňovaný PaxB z *Trichoplax adherens* (TriPaxB) a předpokládají, že je to jediný Pax gen tohoto organismu. Tento Pax obsahuje PD, HD i oktapeptid a fylogenetické studie, které provedli potvrdily jeho bazální postavení k PaxA, B i C u žahavců, což odpovídá postavení vločkovců v živočišné říši. Podivné je postavení žahavčího PaxD, který je ve studii vychází jako sesterský k TriPaxB. Původ PaxD je však nejasný a jeho podobnost k TcPaxB je možná následkem duplikace a divergence dávnějšího genu. Ale mohla by být vysvětlena i prozatím nenažením homologa PaxD u *Placozoa* a *Porifera*, byť by v jejich genomu přítomen byl. Jako druhou alternativu uvažují nedostatečný výběr druhů a špatně zvolený *outgroup* při fylogenetické analýze (Hadrys *et al.*, 2005). Nicméně jejich evoluční model shrnuje víceméně současné poznatky a navrhuje prozatím nejpravděpodobnější scénář vzniku Pax genů.



Obr. 9: Evoluce Pax genů. Schéma nabízí tři pohledy na vznik Pax genů a jejich vývoj. A Představuje alternativu kde Proto – Pax vzniká splynutím PaxA podobné párové domény (PD) a do té doby nezávislé homeodomény (HD); vzniká předchůdce PaxB. Nastíhuje pozdější fúzi jiné HD s PD podobnou PaxA a vznik předchůdce PaxC. Ostatní Pax geny pak odvozuje od těchto dvou zakladatelských Pax genů. B Schéma osvětluje vznik Proto - Pax genu fúzí transpozázové DNA vazebné domény a do té doby nezávislé HD. Vzniklý Proto – Pax (Ur – Pax) by po genové duplikaci dal vzniknout PaxC a PaxD

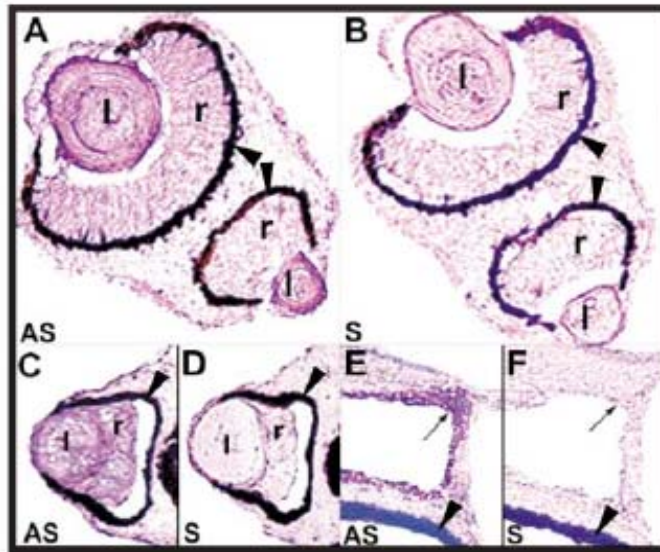
předchůdcům. C Poslední publikovaná teorie vzniku Pax genů se též opírá o původ párové domény v traspozázové DNA vazebné doméně a její fúzi s nezávislou HD. Vznikající Proto – Pax se po inzerci oktapeptidu (krátce po vzniku mnohobuněčných) duplikuje a vzniká původní PaxB od něhož se odvozují všechny skupiny Pax genů vyjma PaxD a jemu příbuzné skupině Pax3/7. Převzato a upraveno z (Hadrys *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2000).

5.3.2.3 *Tripedalia cystophora* PaxB

Ze žahavce *T.c.* byl doposud izolován jediný Pax gen, který je označován jako PaxB (Kozmík *et al.*, 2004) pro svou podobnost s Pax geny s tímto označením izolovanými z jiných žahavců. Z žahavců bylo izolováno více Pax genů, které se poměrně různí ve své struktuře. Do jisté míry je lze podle přítomnosti či redukovanosti HD, modifikací PD, vazebných preferencí, prezence oktapeptidu a jiných znaků zařazovat do tříd Pax genů navrhnutých Balczarkem (Balczarek, 1997) nebo nověji Millerem (Miller, 2000). Podle obdobných kritérií je TcPaxB překvapivým hybridem mezi Pax2/5/8 a Pax6 podrodinami, jak dokázal Kozmík a kolegové (Kozmik, 2003) a představuje pravděpodobně jeden z vývojových prapůvů Pax genů. Jeho hybridní povaha a sdílení funkcí Pax6 a Pax2 je velmi podstatné, protože právě tyto geny jsou těmi očmi specifikujícími u obratlovců (ale třeba i *Drosophily*) a *Tripedalia* má oči obratlovcům morfologicky velmi podobné.

TcPaxB má párovou doménu Pax2 typu a Pax2 oktapeptid, homeodoména je naopak příbuzná spíše podrodinám Pax6 nebo Pax3/7. Ze sekvencí přístupných v GenBank databázi je TcPaxB nejbližší PaxB z *Nematostella vectensis* (Anthozoa, Hexacoralia) – porovnávána celá proteinová sekvence, kde největší homologie jsou v oblasti párové domény a naopak menší již v oblasti homeodomény. Téměř identická je párová doména TcPaxB s párovou doménou medúzy *Chrysaora quinquecirrha* třídy *Scyphozoa*, zde však není k dispozici k porovnání více než právě jen PD. Součástí TcPaxB je i zmiňovaný oktapeptid, který se nachází mezi PD a HD.

Expresce TcPaxB byla prokázána v larvách, retině, čočkách a gastrodermální dutině rhopalia (Kozmik, 2003) a přímo ukazuje na funkci tohoto starobylého transkripčního aktivátora v oblastech odpovídajícím sensorickým orgánům. Série pokusů odhalila, že TcPaxB je skutečným funkčním hybridem mezi Pax2/5/8 a Pax6 podrodinami, a že krystalin J3 je přirozeným cílem TcPaxB genu. Nalezeny byly transaktivační a inhibiční domény typické pro Pax2/5/8 rodinu: dvě C - terminální transaktivační domény TcPaxB lemované inhibiční oblastí. Dále bylo prokázáno, že upregulace TcPaxB pod příslušným



Obr. 10: *In situ* hybridizace na mrazových řezech rhopalia s použitím antisense TcPaxB RNA (A, C a E antisense RNA; B, D a F sense RNA). Fialové zabarvení indikuje přítomnost TcPaxB mRNA. Na panelech E a F je řez gastrodermální dutinou. l, čočka; r, retina. Tučné šipky označují pigmentovou vrstvu za retinou. Tenké šipky v rozích gastrodermální dutiny poukazují na silnou expresi v této struktuře se zatím přesně neobjasněnou funkcí. Převzato z (Kozmik *et al.*, 2003)

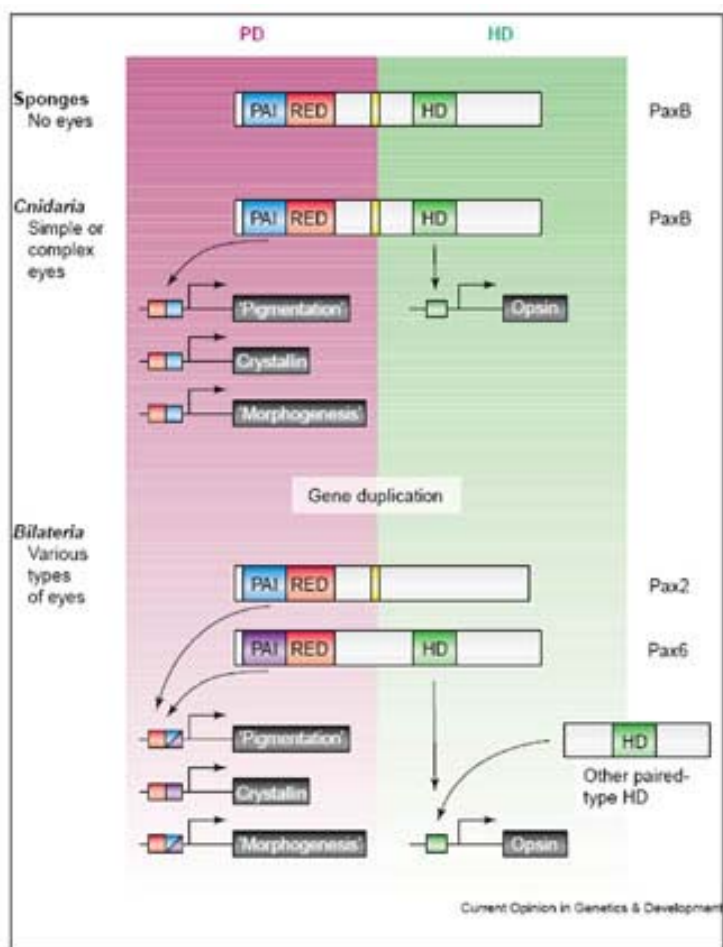
enhancerem dokáže zachránit mutanta *spa^{pol}* (*Drosophila*) fenotypu, který je způsoben absencí Pax2 exprese v čípcích a primárních pigmentových buňkách larvy octomilky (*Drosophila*) a následně v jejich očních discích. Tento pokus ukazuje, že TcPaxB dokáže nahradit *Drosophila* Pax2.

Protože se prokázala tato schopnost TcPaxB zastoupit roli Pax2, bylo testováno zda může nahradit i funkci Ey a Toy (Ey = eyeless = Pax6 *Drosophily*; Toy = twin of eyeless, který vznikl duplikací Ey a následně se jejich funkce rozrůznily) a indukovat tvorbu ektopických očí. Cíleně exprimovaný PaxB skutečně indukoval tvorbu ektopických očí, po jednom na každé tibi. Úspěšnost byla dle očekávání nižší a vytvořená očka menší v porovnání s těmi indukovanými Ey či Toy. V párové doméně byly charakterizovány tři aminokyselinové pozice jako rozhodující pro určení, zda se jedná o párovou doménu Pax2/5/8 typu (typ nalezený u TcPaxB) či Pax6 typu. Pokud byly tyto pozice (Q, R, H) nahrazeny Pax6 specifickými (I,Q,N) a mutant TcPaxB(IQN) použit pro indukci ektopických očí, byly dle očekávání totožné s Ey či Toy indukovanými (Kozmík *et al.*, 2003).

Homeodoména transkripčních faktorů Pax6 aktivuje expresi opsinů vazbou do promotorových sekvencí (např. P3/RCS1 elementu *Drosophila* rhodopsinu1; Sheng *et al.*, 1997). Testováno bylo zda TcPaxB bude schopen aktivace reportérového genu *lacZ* pod kontrolou promotoru *Drosophila* rhodopsinu1 (na rozdíl od Pax2, který postrádá DNA vazebnou homeodoménu). Prokázáno bylo, že TcPaxB je dokonce efektivnější induktor rhodopsin1 promotorem řízeného reportérového genu než myší Pax6 (Kozmík, 2003).

V rhopaliu *Tripedalie* a především v čočkách komplexních očí, jsou majoritními proteiny krystaliny J1, J2 a J3 (diskutováno v následující kapitole). Další ze série testů snažící se odhalit funkční charakter TcPaxB proteinu byla spjata s otázkou, zda TcPaxB bude aktivovat expresi krystalinů a jaký bude mechanismus této aktivace. Aktivace krystalinů TcPaxB byla prokázána, TcPaxB stimuloval aktivitu luciferázy (použitou jako reportér) pod promotory J1A či J1B krystalinů 2-3 krát více oproti negativní kontrole, u promotoru J3 krystalinu se dokonce jednalo o třicetinásobný nárůst. V J3 TATA - box obsahujícím promotoru byly nalezeny dvě putativní vazebné sekvence pro párovou doménu podobné konsenzu vazebné sekvence Pax2/5/8. Mutant PaxB(I84R), který díky této mutaci v oblasti párové domény neváže žádnou z testovaných cílových sekvencí, nestimuloval luciferázu, což napovídá, že vazba do této promotorové oblasti je uskutečňována právě pomocí párové domény a to Pax2 typu. Pax2/5/8 typ párové domény je pro aktivaci důležitý, protože testované Pax1, Pax3 ani Pax6 neaktivovaly J3 promotor (Kozmík, 2003).

Na základě analýzy nukleotidových sekvencí a DNA vazebných testů bylo již v minulosti navrženo, že žahavčí Pax geny si udržely strukturu Pax genů předcházejících moderní Pax2/5/8 a Pax6 (Sun *et al.*, 2001). Sun s kolegy si povšiml, že žahavčí párová doména Pax2/5/8 má širší vazebné spektrum (tak jak ukazuje i Kozmík na TcPaxB), a že některým žahavcům zcela chybí Pax6 podobný zástupce, předpokládá proto, že původ Pax6 je až v době po vzniku předka podobného Pax2/5/8. Kozmík demonstruje, že původním genem regulací sensorických systému nebyl Pax6, ale přinejmenším gen podobný více PaxB než Pax6 a tedy, že post Pax6 coby univerzálního genu pro vývoj očí napříč živočišnou říší (Gehring, 2002) je silně ohrožen.



Obr. 11: Jednoduché schéma vývoje Pax genů ve vztahu k sensorickým systémům (vývoj moderních Pax2 a Pax6 z předka podobného žahavčímu PaxB) shrnující rozdílné role PD a HD v evoluci a strukturní rozdíly mezi PaxB, Pax2 a Pax6. Pod jednotlivými Pax geny jsou znázorněny geny jejichž aktivitu vazbou do promotorových oblastí (značeno obdelníkem barvou odpovídající částem párových domén) regulují. Převzato z (Kozmik, 2005).

5.3.3 Majoritní proteiny čočky – krystaliny

5.3.3.1 Charakteristika krystalinů

Čočka obratlovců se utváří postupným přikládáním podlouhlých buněk původem z ektodermu. Tyto buňky podstupují velkou přestavbu v podobě zprůhlednění a nastavení požadovaného indexu lomu a to tak, že z vláken se ztrácejí organely (v centru čočky mizí dokonce i jádro) a v buňkách jsou syntetizovány proteiny krystaliny, které ovlivňují svým rozložením index lomu v jednotlivých částech čočky (což platí u některých organismů, ale gradientu refrakčního indexu bude pravděpodobně dosahováno i jinak).

Krystaliny pak tvoří až 90% veškeré proteinové výbavy v buňkách čočky (Piatigorsky, 1989). Přítomnost krystalinů není vlastní jen obratlovčím čočkám, jak je popsáno výše, ale i *T.c.* vyvinula čočky s nezbytnými optickými vlastnostmi pro zpracování obrazu (i když jen na základní úrovni; Nilsson *et al.*, 2005) a tyto jsou vyplněny hned třemi druhy krystalinů.

Byť embryonální vývoj čočky různých organismů se různí, výsledek je stejný: průhledný objekt s optickými vlastnostmi umožňujícími průmět obrazu na světločivnou vrstvu (retinu) nacházející se za čočkou nebo případně pouhou koncentrací světla na fotopigment za čočkou (především u bezobratlých). Pozoruhodné je, že krystaliny, zprostředkovávající tuto funkci se mezi organizmy velmi různí, společné však mají vlastnosti, které jim umožní jako krystaliny vůbec fungovat: tedy zůstat v rozpustné formě ve vysokých koncentracích (pokud dojde k jejich denaturaci, čočka se zakalí) a vydržet tak velmi dlouhou dobu (neboť neexistuje možnost náhrady, buňky ztratily i jádro; buňky lidské čočky tak musí zůstat nezměněny po desítky let).

Ještě překvapivější je, že kromě funkce strukturních proteinů krystalinů v organismu pak zastávají tyto proteiny často i enzymatickou funkci. Kupříkladu ptačí krystalin *e* je laktátdehydrogenázou a chobotnice ve své čočce využívá glutathion S - transferázu (GST) (Tomarev, 1993). Obecně lze říci, že krystaliny jsou často rekrutovány z rodin *heat shock* proteinů nebo oxidoreduktáz, což není dílem náhody, ale vhodné využití proteinů odolných oxidativnímu stresu a obecně denaturaci (jakými obě zmíněné skupiny jsou). Tento fenomén nazývaný *gene sharing* (tedy sdílení genů; Piatigorsky, 2003), kdy jeden genový produkt je využíván k rozdílným funkcím (třeba i po menší úpravě jakým je štěpení GST krystalinu chobotnice) je považován za evoluční strategii zvyšující využitelnost genomu.

To, co činí krystaliny krystaliny, je právě exprese v čočce ve vysokých koncentracích. Genové regulace skrývající se za daným expresním patternem a jejich změny pak lze považovat za podobné nástroje jakými jsou v evoluci genová duplikace a změna struktury proteinu navozená mutací (Piatigorsky, 2003).

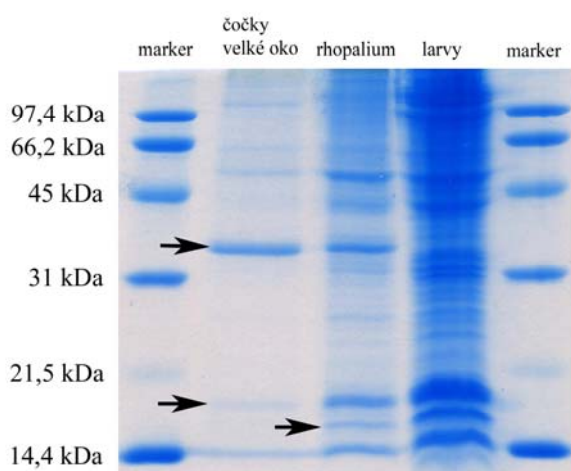
Krystaliny ale nemusí být jen dílem využití *gene sharing* strategie, pravděpodobně stačí, aby proteiny měli ty správné vlastnosti a *zajištěnou expresi a regulovatelnost v čočce*, aby se mohly stát krystalinem. Z toho vyplývá, že společnou další charakteristikou krystalinů je regulovatelnost podobnými transkripčními faktory a přítomnost podobných regulačních elementů v promotorových sekvencích, zajišťujících správný expresní pattern.

Původ zajištění exprese v čočce a vznik příslušných regulačních elementů je otázkou (Piatigorsky, 2003).

Z tohoto pohledu se velmi zajímavá situace vyvinula u našeho modelového organismu *Tripedalia cystophora*. Z čoček jejího malého i velkého komplexního oka byly popsány tři krystaliny (J1, J2 a J3). Přitom každý z nich má nejspíše odlišný původ a byl získán jinou cestou.

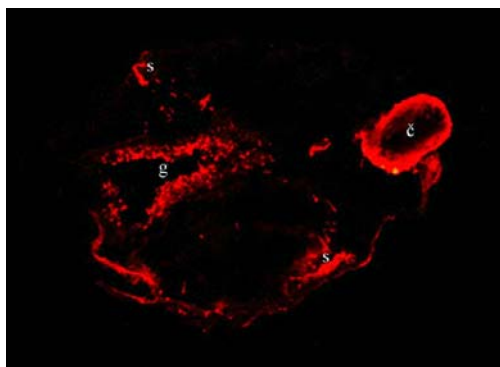
5.3.3.2 Krystaliny organismu *Tripedalia cystophora*

Když v roce 1989 Piatigorsky s kolegy vypreparovali velké čočky z *T.c.* a homogenizované vzorky analyzovali na proteinovém gelu, byly jako výsledek popsány tři pruhy (bandy), které měly odpovídat jednotlivým krystalinům, majoritním proteinům čočky. Nazvány byly J1 (35 kDa), J2 (19,5 kDa) a J3 (19 kDa) (Piatigorsky *et al.*, 1989). Při stejném postupu u čoček z organismu *Carybdea marsupialis* však obdrželi pruhy a tedy jim odpovídající krystaliny pouze dva. Obdobných výsledků jsem dosáhl opakováním i pro *T.c.*, je však možné, že absence třetího pruhu odpovídajícího J3 krystalinu je následkem použití malého množství čoček či odlišného pufovacího systému (nerozdělení J2 a J3 pruhů), než jaký byl použit Piatigorským v r. 1989 (Piatigorsky, 1989). Krystaliny *T.c.* byly sekvenovány jako peptidy a pro dva z nich byla nalezena homologie s již známými proteiny.



Obr. 12: Proteinový gel s nanesenými vzorky *T.c.* z 25 vypreparovaných čoček z velkého oka, celého rhopalium a pigmentovaných larev. Tři šipky odpovídají jednotlivým krystalinům, J1 35 kDa, J2 19,5 kDa, J3 19 kDa. (K. Jonášová, nepublikované výsledky).

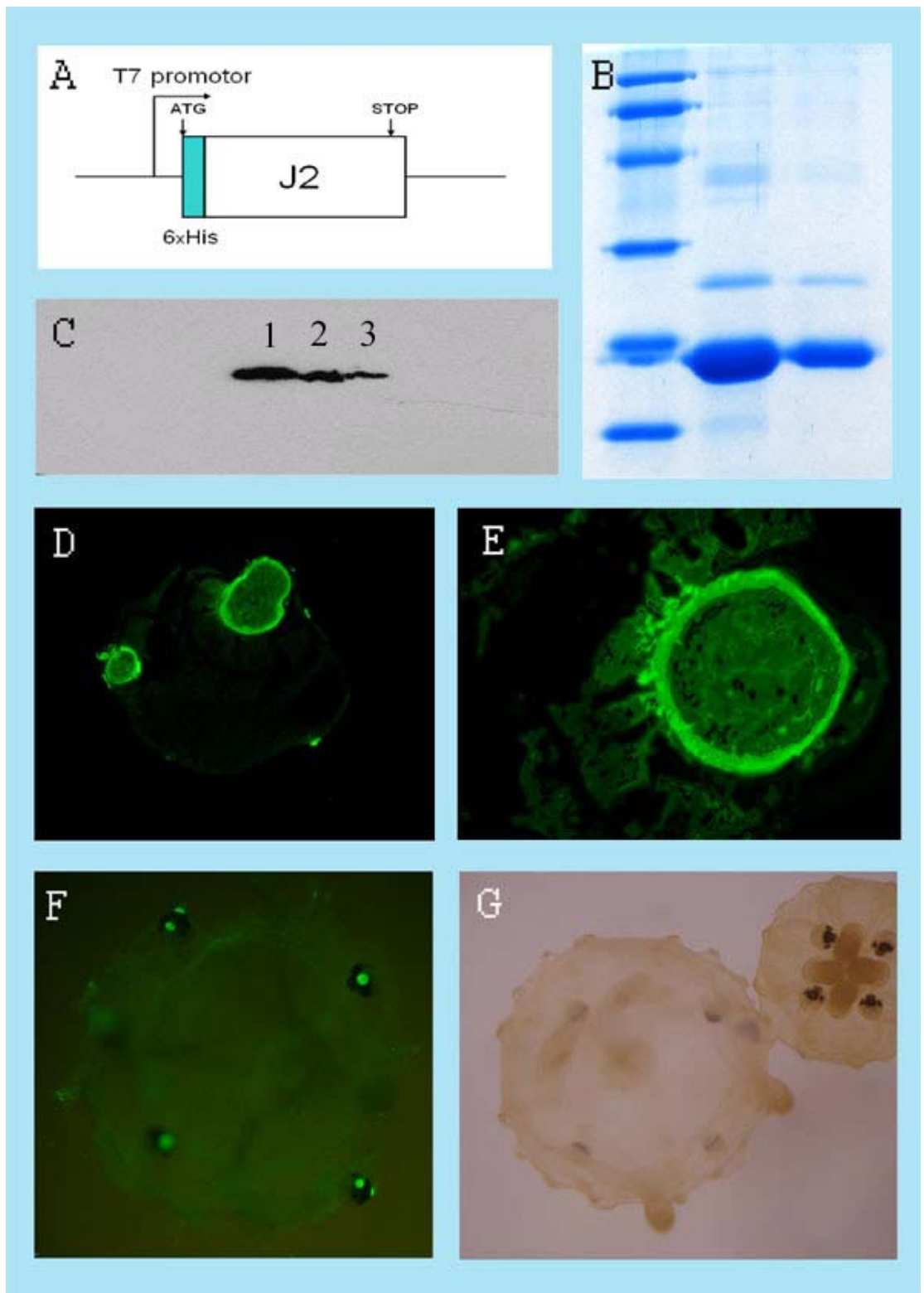
Pro J1 krystalin, který je nejhojnějším krystalinem čočky *T.c.*, byla nalezena homologie s ADP - ribozylglykohydrolázou, proteinem blízkým rodině selenoproteinů SelJ (Castellano *et al.*, 2005). Následně byly izolovány tři cDNA kódující 37 kDa proteiny J1 krystalinu (J1A, J1B a J1C) identické v aminokyselinovém složení v 84 – 98%. Bylo prokázáno, že každý z těchto proteinů je kódován samostatným genem, a že ve všech případech postrádají introny (což by naznačovalo jejich možný původ z bakteriálních genomů). Přestože v kódující oblasti jsou prakticky shodné, analýza promotorových sekvencí odhalila jejich absolutní odlišnost. Když o šestnáct let později skupina Castellana a jeho kolegů objevila novou rodinu selenoproteinů SelJ, při analýze našli největší homologii právě s J1 krystalinem. U J1 je však na místě selenocysteinu pouze cystein (Castellano *et al.*, 2005). Pro objasnění potenciální role SelJ (který přísluší do podrodiny rodiny enzymů zajišťující ADP ribozylaci) jako krystalinu, analyzovali promotorové oblasti několika SelJ a J1A, J1B a J1C ve snaze nalézt v těchto velmi vzdálených sekvencích vazebnou oblast, která by je determinovala k expresi v čočce. A skutečně vazebná místa pro některé Pax geny (včetně Pax6) byla nalezena ve všech studovaných sekvencích. Následná studie lokalizace exprese SelJ u *Danio rerio* potvrdila lokalizaci v čočce během embryogeneze, pro starší jedince byla typická širší exprese (Castellano *et al.*, 2005). Homologie J1 krystalinu právě s SelJ podrodinou selenoproteinů vyskytujících se pouze u paprskoploutvých ryb a jednoho druhu ježovky (přičemž všechny prozatím popsané selenoproteiny měli zástupce i mezi savci) a s homologií k bakteriálním ADP - ribozylačním enzymům nám naznačuje podivnost původu těchto genů.



Obr. 13: Imunochemické barvení s využitím protilátky proti J1 krystalinu (červený signál) na mrazovém řezu rhopaliem v rovině *slitů* a velkého oka s čočkou. č, čočka; s, *slit*; g, gastrodermální dutina. (K. Jonášová, nepublikované výsledky)

Po stanovení sekvence peptidů J2 proteinu nebyla nalezena žádná homologie a to trvá dodnes, kdy jsou již známy kompletní genomy mnoha organismů. Podařilo se ale získat částečnou aminokyselinovou sekvenci J2 proteinu a pomocí té pak kompletní cDNA (Z. Kozmík, nepublikované výsledky). Tato cDNA byla následně využita ke konstrukci expresního plazmidu, produkovaný protein J2 izolován a použit pro přípravu protilátky (imunizací králíka). Získané sérum se specifickou protilátkovou odpovědí proti J2 bylo testováno na western blotu s nanesenými vzorky čoček z rhopalií a specifita protilátek proti J2 byla potvrzena. Pomocí této protilátky byla stanovena lokalizace exprese J2 a to v periferních vrstvách čoček jak HOČ tak DOČ (což koresponduje s *in situ* RNA hybridizačními testy; J. Růžičková, osobní sdělení), v úzkém okolí statolitu a na špičkách chapadel juvenilních medúz. Provedena byla řada imunochemických barvení za cílem detekce J2 v různých vývojových stádiích a totéž je testováno s využitím western blotů (viz. Obr. 14).

J3 protein jako krystalin je diskutabilní. V původní práci z r. 1989 se mělo jednat o třetí pruh na proteinovém gelu o velikosti necelých 19 kDa z izolovaných čoček velkého komplexního oka. Nicméně v práci z r. 2001, kde je J3 podrobněji analyzován Piatigorsky s kolegy již hovoří o J3 proteinu izolovaném z rhopalií. Důvod proč tento rozkol zmiňujeme je výsledek námi zopakované proteinové charakterizace izolovaných čoček z velkých komplexních očí, kde jsou přítomny proužky prezentující krystaliny pouze dva, třetí proužek přibývá ve chvíli, kdy nanese nikoli izolované čočky, ale celá rhopalia (viz. Obr. 12). Minimální přítomnost J3 krystalinu v čočce podporuje i provedená *in situ* RNA hybridizace, která ukazuje na slabý signál na okraji čočky a naopak ukazuje silnou expresi v oblasti gastrovaskulární dutiny rhopalia a na koncích chapadel; RNA byla detekována i v prouzcích vybíhajících za pigmentovou vrstvou (Piatigorsky, 2001, zopakováno se shodným výsledkem J. 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). V J3 krystalinu se nachází dvě SapB domény a při porovnání s NK lyzinem (saposin s J3 podobnou Sap doménou) byl navržen možný vznik druhé z nich intragenovou duplikací. Překvapivě byla zjištěna odlišná molekulární hmotnost pro protein indikovaný pomocí proteinové elektroforézy (19 kDa) a protein kódovaný izolovanou J3 cDNA (28,6 kDa). Tato neshoda je však pravděpodobně jen



Obr. 14: J2 krystalin a jeho exprese v rámci rhopalia i celé juvenilní medúzy. A Konstrukt s vloženým ORFem pro J2, který byl použit pro expresi rekombinantního J2. B J2 byl izolován s využitím histidinové kotvy (6xHis) na N konci (dva silné proužky představují krystalin). C Specifita protilátkové odpovědi J2 imunizovaného králíka byla testována na

Western blotu s nanesenými celými rhopalii (1), čočkami z malého oka (2) a čočkami z velkého oka (3). D Imunochemická detekce na mrazovém řezu rhopalii s využitím získané protilátky ukázala na expresi v periferních vrstvách čočky malého (levý zelený signál) i velkého oka (pravý zelený signál). E Detail lokalizace J2 krystalinu na řezu čočkou velkého oka, vlevo od čočky je situována retina. F Využití protilátky pro detekci J2 krystalinu v rámci celé juvenilní medúzy. Tmavé objekty jsou rhopalii, zelené signály odpovídají jednotlivým čočkám. G Stádium juvenilní medúzy odpovídající stádiu použitému pro detekci J2 krystalinu v juvenilní medúze. Zvonem prosvítají čtyři rhopalii. Vpravo převrácená mladší juvenilní medúza. (K. Jonášová, nepublikované výsledky).

příkladem další vlastnosti, kterou sdílí J3 a saponiny, které při maturaci prochází proteolytickým štěpením.

Další zajímavostí je přítomnost neurotrofního peptidu prosaptidu v sekvenci krystalinu J3 (nalezen v Saposinu C), který v obratlovcích působí jako *Schwann-cell survivor factor* (růstový faktor Schwannových buněk) a dokládá opravdovou multifunkčnost saponinů (Piatigorsky *et al.*, 2003). Role krystalinů tak může být jen další z těch, které umí zastoupit, což přesně zapadá do rámce teorie evoluce krystalinů prostřednictvím *gene sharing* strategie.

Tripedalia cystophora na příkladu krystalinů opět dokazuje jak cenným je modelovým organizmem, zejména pro studium evoluce očí a tedy pro nahlížení pod pokličku takovým událostem jako je vznik krystalinů a čočky nebo evoluce fotoreceptorů (viz. kapitola následující).

5.3.4 Fotoreceptorové proteiny – opsiny

5.3.4.1 Charakteristika opsinů

Základem každého fotoreceptivního systému nutně musí být entita reagující na světlo. Tou jsou u mnohobuněčných živočichů většinou fotopigmenty s proteinovou složkou, transmembránovým sedmihelixovým proteinem, opsinem a jím vázaným chromoforem retinalem. Retinal je vázán lyzinovým zbytkem opsinu a je prvním fotosenzorem. Po absorpci světelného záření (fotonů) mění svoji konformaci z *cis* na *trans* a tato konformační změna následně vyvolá i změnu konformace v proteinové složce - opsinu.

Fotopigment je uložen ve fotoreceptorových buňkách, které u některých organismů vytváří světločivnou vrstvu - retinu. Morfologie fotoreceptorových buněk (v jakých strukturách je uložen opsin) a typ opsinu (na molekulární úrovni je lze podle sekvence přesně dělit) rozděluje fotoreceptory na dva základní typy. Prvním je ciliární (výběžky apikální části fotoreceptorové buňky v podobě cilií) s ciliárními typy opsinů, zastupují je především obratlovci. Druhým je typ rhabdomerický (výběžky fotoreceptorové buňky v podobě mikrovillí jsou vyplněny opsiny), tento typ je rozšířen především mezi bezobratlými.

Opsiny jsou velkou rodinou proteinů v (současné době je známo přes tisíc členů), ale jen některé z nich se účastní přímo vidění (Terakita, 2005). Molekulárně fylogenetická analýza odhalila sedm podrodin opsinů, přičemž toto dělení dobře koresponduje s funkční klasifikací opsinů. O většině z těchto podrodin máme jen málo informací.

G_q-coupled opsin podrodina je právě tou lokalizovanou v mikrovillích rhabdomerických fotoreceptorů a na rozdíl od ciliárních opsinů mají tyto fotoreceptory ve své fototransdukční kaskádě angažovanou fosfolipázu C. Velmi podobné a do téže podskupiny řazené jsou obratlovčí *melanopsiny*, které byly popisány ve spojitosti s nastolením cirkadiálního rytmu v závislosti na světle. Další velkou skupinu tvoří trochu chybně označovaná podrodina *obratlovčích vizuálních a nevizuálních opsinů*, kde nalezneme především ciliární opsiny nacházející se v ciliích ciliárních fotoreceptorů. Některé podskupiny, mezi nimi i zmiňovaná *G_q-coupled opsin* podrodina, mají své zástupce mezi prvoústými a druhoústými organizmy. Toto naznačuje, že rozrůznění opsinů proběhlo ještě před rozdělením prvoústých a druhoústých a podporuje domněnku, že společný předek prvoústých a druhoústých měl vícero genů kódujících opsiny nikoli jeden, který by mohl být považován za společného předka všem dnešním opsinům (Terakita, 2005). Že historie několika odlišných opsinových genů přítomných v jednom genomu sahá ještě daleko za předěl mezi prvo- a druhoústými dokládá *T.c.* stojící ještě před předělem mezi samotnými diblastiky a triblastiky.

Kromě rozdílů v morfologii a sekvenční podobnosti opsinů je mezi rhabdomerickými a ciliárními fotoreceptorovými buňkami velký rozdíl i v dráze signální transdukce, kterou využívají k přenosu signálu (Obr. 15). Dopad fotonů na retinal a jeho konformační změna a následná konformační změna opsinu aktivují G protein transducin (odlišný u obou typů fotoreceptorů) a ten v případě ciliárních receptorů stimuluje cGMP

fosfodiesterázu, což vede k poklesu koncentrace cGMP v buňce, uzavření cGMP řízených (otvíraných) kationtových kanálů a následné *hyperpolarizaci* buňky. U rhabdomerických fotoreceptorů G protein transducin aktivuje fosfolipázu C štěpící fosfatidylinositoldifosfát na diacylglycerol a inositoltrifosfát, což ve výsledku vede ke změně v koncentraci vápenatých kationů a následné *depolarizaci* fotoreceptorové buňky (Gomez a Nasi, 2005).

5.3.4.2 Opsiny organismu *Tripedalia cystophora*

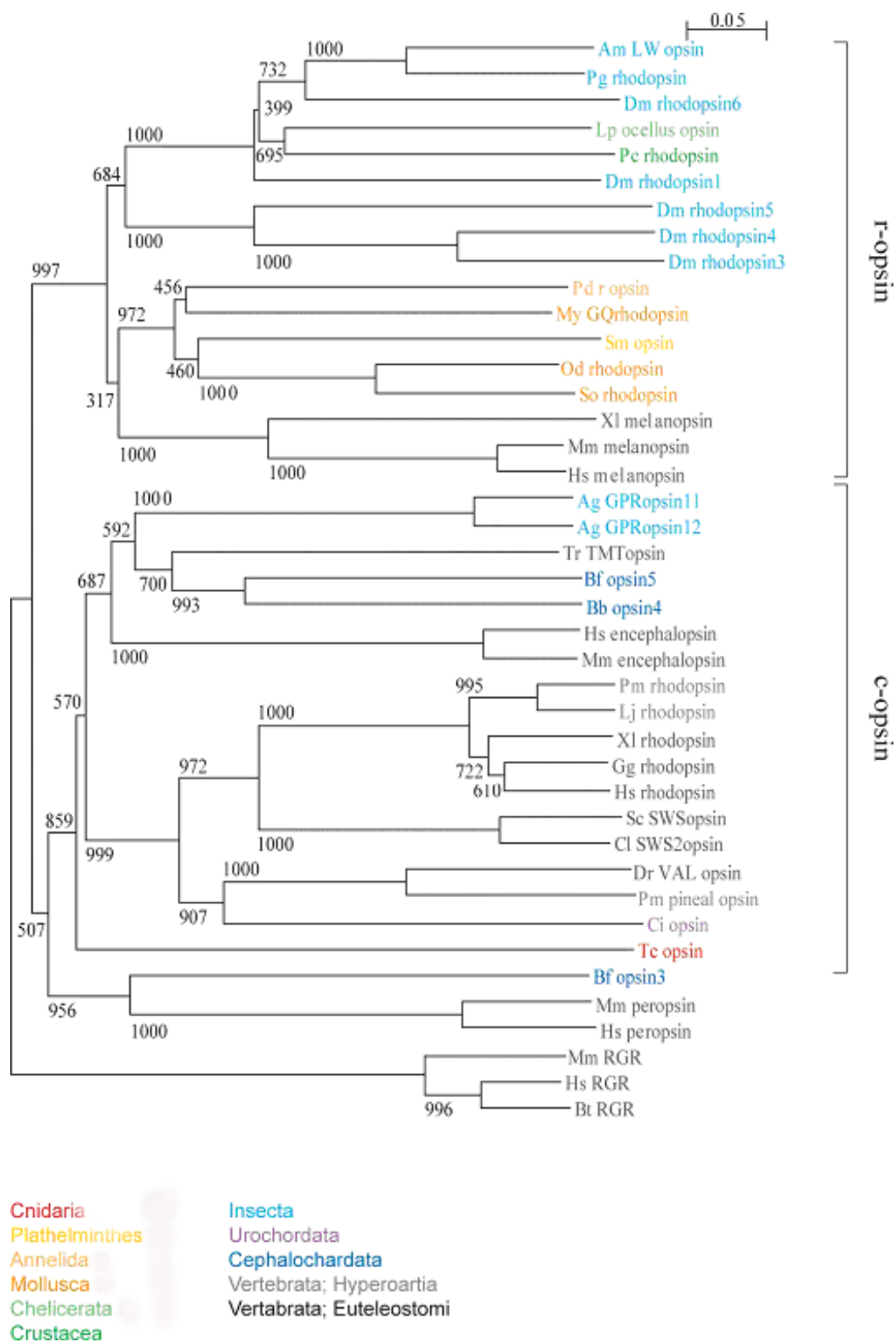
Studium jednotlivých komponent vizuálního systému u nejrůznějších organismů je nutným předpokladem pokud chceme studovat evoluci tak rozmanitého orgánu jako je oko. Základem i toho nejprimitivnějšího oka vždy bude fotopigment lokalizovaný nejlépe při povrchu fotoreceptorové buňky se snahou o umístění v co největší ploše zvyšující citlivost k nízkým světelným hladinám (využíváno je struktur jako jsou mikrovilli a cilie, podle kterých je možné morfologicky stanovit, o který ze dvou typů fotoreceptorů popsaných výše se jedná). U *T.c.* byly pravděpodobně nalezeny oba typy fotoreceptorů. Za rhabdomerický typ lze po morfologické stránce označovat fotoreceptorové buňky larev, *ocelli* na posteriorním konci těla, popsané v kapitole o larválním stádiu (Nilsson, 2005).

Charakter či sekvence opsinu, který je předpokládán v mikrovillích vyplňujících pigmentový pohárek však nejsou prozatím známy. Obecně téměř všichni bezobratlí využívají pro vidění rhabdomerické fotoreceptory, ciliární jsou naopak typické pro obratlovce. Dalo by se předpokládat, že i opsin komplexních očí *T.c.* bude rhabdomerického typu. Z předchozí strukturální charakterizace se však fotoreceptorové buňky (PRC) jeví spíše jako ciliární. Toto bylo nakonec potvrzeno po charakterizaci opsínového genu identifikovaného a izolovaného z rhopalí *T.c.* (Z. Kozmík, osobní sdělení; nepublikované výsledky). Nukleotidová sekvence TcOpsinu byla převedena do proteinové a porovnána s proteinovými sekvencemi mnoha ciliárních i rhabdomerických opsínů. Po vytvoření mnohočetného přiřazení a následné fylogenetické analýze byl TcOpsin zařazen mezi ciliární opsiny (viz. Obr. 16). V molekulárním fylogenetickém stromu vytvořeném pro posouzení pozice TcOpsinu v rámci opsínových podrodin se TcOpsin nachází na bázi *G_q-coupled opsin/melanopsin* podrodiny, která prezentuje právě ciliární opsiny, poněkud obratlovců.

Do rodiny ciliárních opsínů ho řadí i přítomnost diagnostických aminokyselin za sedmým helixem v C – terminální oblasti (Arendt *et al.*, 2004) typických spíše pro ciliární

než rhabdomerické. I když zde určení nebylo zdaleka tak striktní jako v případě mnohoštětinatce *Platynereis dumerlii*, kde se kromě rhabdomerických fotoreceptorů v světločivných orgánech se nalézají i ciliární a to v oblasti hlavové CNS (Arendt *et al.*, 2004). Autoři této publikace vyslovují hypotézu o původu opsinů ve smyslu existence jediného opsinu u časných mnohobuněčných majících PRC s jednoduchou morfologií a jeho následné duplikace v předkovi všech bilaterálně symetrických živočichů (*Bilateria*), která by dala vzniknout dvěma paralogům: ciliárnímu a rhabdomerickému opsinu. U předků skupiny *Bilateria* by podle jejich teorie rhabdomerické PRC asociovaly s pigmentovými buňkami a vytvořily by jednoduché oko, kdežto ciliární PRC by formovaly část vyvíjejícího se mozku účastnící se nepřímé fotoodpovědi. Toto původní uspořádání je pak možné pozorovat u bazálních organizmů skupiny *Bilateria* jako je jejich modelový mnohoštětinátec *Platynereis*. V evoluční linii vedoucí k obratlovcům by posléze byly oba typy PRC inkorporovány do víceméně z mozku se vyvíjející retiny. Rhabdomerické PRC by byly transformovány na gangliové buňky, ciliární by se staly hlavními fotoreceptory přítomnými v čípcích a tyčinkách obratlovčí retiny.

Se znalostí sekvence opsinu z organismu, který je předchůdcem skupiny *Bilateria* a přesto již disponuje opsinem ciliárního typu, začíná být teorie diskutabilní. Avšak je možné, že onen předek opsinů byl o něco více podobný ciliárnímu typu (což by se odráželo na *T.c.*) a po duplikaci se druhý rozrůznil směrem k rhabdomerickému typu, kdežto první zůstal věrný víceméně původnímu modelu. Navíc je třeba připomenout, že TcOpsin v rámci ciliárních opsinů je zcela bazální a ostatním sekvencím poměrně vzdálen. Druhým problémem však je pravděpodobná přítomnost i rhabdomerického fotoreceptorového typu v larválním a možná i dospělém jedinci. Možné tedy je i to, že předek skupiny *Bilateria* již měl opsinových genů více.



Obr. 16: Fylogenetický strom vybraných zástupců rodiny opsínů znázorňující postavení TcOpsinu (červeně). Strom byl vytvořen s použitím programu ClustalX (neighbour joining algoritmus) na základě mnohočetného přiřazení (použit ClustalX a GeneDoc). (K. Jonášová, nepublikované výsledky).

6. Závěr

Doufáme, že tento text alespoň z části nastínil výjimečnost žahavce *Tripedalia cystophora* pro studium senzorických systémů a jejich původu. *Tripedalia cystophora*, čtyřhranka, u níž byl jako u mnohobuněčného živočicha popsán nejjednodušší typ fotoreceptoru v podobě jediné buňky a zároveň bylo popsáno komplexní oko podobné našim očím je v tomto směru objektem skutečně unikátním.

Snažili jsme se poukázat na neobyčejné vlastnosti tohoto modelového systému. Mimo jiné i na překvapivou podobnost komponent vizuálního systému a komplexity genomu *T.c.* a obratlovců, a to po stránce morfologické i molekulární. Tam, kde by byla očekávána větší příbuznost genů *T.c.* k bazálnějším skupinám organismů prezentovaných například octomilkou *Drosophila melanogaster* či háďátkem *Caenorhabditis elegans* nacházíme větší podobnost se sekvencemi obratlovců. Například je-li stínícím pigmentem v lidských očích melanin, je jím tento pigment i v očích *T.c.* a byť bychom očekávali v medúze pro bezobratlé typický rhabdomerický typ opsinu, bude jim překvapivě typ ciliární, typický pro retiny obratlovců. Porovnáme-li i další proteiny *T.c.* nalézáme obecně větší podobnost lidskému než bazálnějším modelovým organismům. To může být vysvětleno jako ztráta skupin genů v určitých vývojových liniích a naopak jejich udržení v linii žahavců, která směřovala až k dnešním čtyřhrankám (*Cubozoa*) a dále až k lidem. Tento fakt by byl velkou výhodou pro studium evoluce skupin genů jakými jsou například Pax geny řídící vznik oka či geny podílející se na ustanovení bilaterální symetrie, která se překvapivě již u *T.c.* vyskytuje. Zmíněná genová konzervace u *Tripedalia cystophora* činí tento nový modelový organizmus ještě zajímavějším.

7. Seznam citované literatury

- Arendt, D. (2003): Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int. J. Dev. Biol.*;47:563-571.
- Arendt, D., Tessmar-Raible, K., Snyman, H., Dorresteijn, A.W., Wittbrot, J. (2004): Ciliary Photoreceptors with a Vertebrate-Type Opsin in an Invertebrate Brain. *Oct* 29;306(5697):869-71.
- Balczarek, K.A., Lai, Z.C., Kumar, S. (1997): Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol.* 1997 Aug;14(8):829-42.
- Breitling, R., Gerber, J.K. (2000): Origin of the paired domain. *Dev Genes Evol*;210:644-650.
- Bridge, C., Cunningham, W., Schierwater, B., DeSalle, R., Buss, L.W.(1992): Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Mol Biol Evol.* Jul;12(4):679-89.
- Bridge, C., Cunningham, W., DeSalle, R., Buss, L.W. (1995): Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Mol Biol Evol*; Jul;12(4):679-89.
- Castellano, S., Lobanov, A.V., Chapple, C., Novoselov, S.V., Albrecht, M., Hua, D., Lescure, A., Lengauer, T., Krol, A., Gladyshev, V.N., Gigo, R. (2005): Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family. *PNAS* Nov 8;102(45):16188-93.
- Coates, M.M. (2003): Visual Ecology and Functional Morphology of Cubozoa (Cnidaria). *Integr. Comp. Biol.*;43:542-548
- Conant, F.S. (1898): Notes on the Cubomedusae. *Journ. Morph.* Nov; 132:8-10.
- Cvekl, A., Piatigorski, J. (1996): Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays* Aug;18(8):621-30.
- Czerny, T., Schaffner, G., Busslinger, M.(1993): DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev*;7:2048-2061.
- Czerny, T., Busslinger, M. (1995): DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol.*; May 15; 15(5):2858-71
- Eberhard, D., Jimenez, G., Havey, B., Busslinger, M. (2000): Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. *EMBO J.*; May 15;19(10):2292-303.

- Ferrier, D.E., Holland, R.W. (2001): Ancient origin of the Hox gene cluster. *Nat Rev Genet.* Jan;2(1):33-8.
- Galliot, B., Miller, D. (2000): Origin of anterior patterning: how old is our head? *TIG;* Jan;16(1):1-5.
- Galliot, G., Schmidt, V. (2002): Cnidarians as a Model System for Understanding Evolution and Regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 39-48
- Garm, A., Ekström, P., Boudek, M., Nilsson, D.E. (2006): Rhopalia are integrated parts of the central nervous system in box jellyfish. *Cell Tissue Res.* Mar 24 [Epub ahead of print]
- Gehring, W.J. (2002): The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 65-73
- Gomez, M.P., Nasi, P. (2005): A Direct Signaling Role for Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP2) in the Visual Excitation Process of Microvillar Receptors. *J. Biol. Chem.*;29;280(17):16784-9.
- Hadrys, T., DeSalle, R., Sagasser, S., Fischer, N., 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.* Jul;22(7):1569-78.
- Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kun, K., Happel, C.M., Laue, C.C., Snyder, P., Rothbacher, U., Holstein, T.W. (2000): WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* 14;407(6801):186-9.
- Hoshiyama, D., Suga, H., Iwabe, N., Koyanagi, M., Nikoh, N., Kuma, K., Matsuda, F., Honjo, T., Miyata, T. (1998): Sponge Pax cDNA related to Pax-2/5/8 and ancient gene duplications in the Pax family. *J Mol.Evol.*; Dec;47(6):640-8.
- Kortschak, R.D., Samuel, G., Saint, R., Miller, D.J. (2003): EST Analysis of the Cnidarian *Acropora millepora* Reveals Extensive Gene Loss and Rapid Sequence Divergence in the Model Invertebrates. *Current Biology*;13:2190-2195.
- Kozmik, Z. (2005): Pax genes in eye development and evolution. *Curr Opin Genet Dev.* Aug;15(4):430-8.
- Kozmik, Z., Daube, M., Frei, E., Norman, B., Kos, L., Dishaw, L.J., Noll, M., Piatigorsky, J. (2004): Role of Pax genes in eye evolution: a cnidarian PaxB gene uniting Pax2 and Pax6 functions. *Dev Cell.* Nov;5(5):773-85.
- Larroux, C., Fahey, B., Liubicich, D., Hinman, V.F., Gauthier, M., Gongora, M., Green, K., Worheide, G., Leys, S.P., Degnan, B.M. (2006): Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evol Dev.* Mar-Apr;8(2):150-73.
- Martin, V. (2002): Photoreceptors of cnidarians. *Can. J. Zool.*;80:1703-1722.
- Miller, D.J., Hayward, D.C., Reece-Hoyes, J.S., Scholten, I., Catmull, J., Gehring, W.J., Callaerts, P., Larsen, J.E., Ball, E.E. (2000): Pax gene diversity in the basal cnidarian

- Acropora millepora (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the Pax gene family. PNAS Apr 25;97(9):4475-80.
- Nilsson, D., Gislén, L., Diates, M.M., Skogh, Ch., Garm, A. (2005): Advanced optics in a jellyfish eye. Nature May 12;435(7039):201-5.
- Nordström, K.m Wallén, R., Seymour, J., Nilsson, D. (2003): A simple visual system without neurons in jellyfish larva. Proc Biol Sci. Nov 22;270(1531):2349-54.
- Parkefelt, L., Skogh, Ch., Nilsson, D., Ekström, P. (2005): Bilateral symmetric organization of neural elements in the visual system of a coelenterate, *Tripedalia cystophora* (Cubozoa). J Comp Neurol.; Nov 21;492(3):251-62.
- Piatigorsky, J. (1989): Lens crystallins and their genes: diversity and tissue-specific expression. FASEB J. Jun;3(8):1933-40.
- Piatigorsky, J., Horwitz, J., Norman, B.L. (1993): J1-crystallins of the cubomedusan jellyfish lens constitute a novel family encoded in at least three intronless genes. J Biol Chem.; Jun 5;268(16):11894-901.
- Piatigorsky, J., Norman, B., Dishaw, L.J., Kos, L., Horwitz, J., Steinbach, P.J., Kozmik, Z. (2001): J3-crystallin of the jellyfish lens: similarity to saposins. PNAS; Oct 23;98(22):12362-7.
- Piatigorski, J. (2003): Gene Sharing, Lens Crystallins and Speculations on an Eye/Ear Evolutionary Relationship. Integr. Comp. Biol.;43:492-499.
- Piatigorsky, J., Kozmik, Z. (2004): Cubozoan jellyfish: an Evo/Devo model for eyes and other sensory systems. Int J Dev Biol. 2004;48(8-9):719-29.
- Satterlie, R.A., Nolen, T.G. (2001): Why do cubomedusae have only four swim pacemakers? J Exp Biol. Apr;204(Pt 8):1413-9
- Satterlie, R.A., Thomas, K.S., Gray, G.C. (2005): Muscle Organization of the Cubozoan Jellyfish *Tripedalia cystophora* Conant 1897. Biol. Bull. 209: 154-163.
- Sheng, G., Thouvenot, E., Schmucke, r D., Wilson, D.S., Desplan, C. (1997): Direct regulation of rhodopsin 1 by Pax-6/eyeless in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors.
- Spring, J., Yanze, N., Middel, A.M., Stierwald, M., Gröger, H., Schmid, V. (2000): The mesoderm specification factor Twist in the life cycle of jellyfish. Dev. Biol. 228: 363-375.
- Straehler-Pohl, I., Jarms, G. (2005): Life cycle of *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cubozoa, Carybdeidae) reveals metamorphosis to be modified strobilation. Marine Biology. Genes Dev. May 1;11(9):1122-31.
- Sun, H., Dickinson, D.P., Costello, J., Li, W.H. (2001): Isolation of *Cladonema* Pax-B genes and studies of the DNA-binding properties of cnidarian Pax paired domains. Mol Biol Evol. Oct;18(10):1905-18.

Terakita, A. (2005): The opsins. *Genome Biology*;6(3):213.

Tomarev, S.I., Zinovieva, R.D., Guo, K., Piatigorsky, J. (1993): Squid glutathione S-transferase. Relationships with other glutathione S-transferases and S-crystallins of cephalopods. *J Biol Chem*. Feb 25;268(6):4534-42.

Vaccaro, A.M., Salvioli, R., Tatti, M., Ciaffoni, F. (1999): Saposins and Their Interaction with Lipids. *Neurochem Res*. Feb;24(2):307-14.

Werner, B., Cutress, C.E., Studebaker, J.P. (1971): Life cycle of *Tripedalia cystophora* Conant (Cubomedusae). *Nature*. Aug 20;232(5312):582-3.

Zacharias, H., Anokhin, B., Khalturin, K., Bosch, T.C. (2005): Genome sizes and chromosomes in the basal metazoan *Hydra*. *Zoology (Jena)*;107(3):219-27.