

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

Vlastnosti a distribuce fotoreceptorů u striktně podzemních rypošů čeledi
Bathyergidae

Tereza Krejčová

Praha 2010

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavel Němec, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně jen s použitím zde uvedených literárních pramenů.
Tereza Krejčová

Ráda bych moc poděkovala svému školiteli Mgr. Pavlu Němcovi, Ph.D., že mě přivedl k tak zajímavému tématu, jakým zrakový systém podzemních hlodavců bez pochyby je, a za cenné odborné rady, připomínky a pomoc při jeho zpracování.

Za pomoc a odborné konzultace patří můj dík Prof. Leo Peichlovi (Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt a. M., Germany). Za praktickou pomoc a rady děkuji také Anice Glaschke (Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt a. M., Germany).

Můj dík patří také mým rodičům, partnerovi a sestře za psychickou podporu a za pomoc s opravou gramatických chyb a stylistických obrátů v rukopisu práce.

Tato diplomová práce vznikala v letech 2008-2010 pod finančním zabezpečením projektu Grant GAČR 206/09/1364, Neurobiologie podzemního vidění (Řešitel Mgr. Pavel Němec, Ph.D.).

Photoreceptor properties and distribution in strictly subterranean African mole-rats (Rodentia, Bathyergidae)

The visual system of subterranean rodents is assumed to be regressed in response to their lightless ecotope. According to the prevailing doctrine, negative or non-selective processes have driven evolutionary regression of the visual system in many unrelated groups of rodents that has adopted strictly subterranean mode of life. Among rodents this has been exemplified by detailed studies of the blind mole-rat *Spalax ehrenbergi*. However, recent studies involving a larger spectrum of subterranean rodent species demonstrated unexpected diversity of retinal properties and visual system designs among subterranean rodent species and thus challenged the widely held view that the visual system has undergone extensive convergent evolution in subterranean mammals. This paper examines the presence, the distribution, and photoreceptor properties in the African mole-rats (Bathyergidae, Rodentia). It describes rodopsin, S- and L-opsin expression patterns, photoreceptor densities and rod/cones proportions in five species of bathyergid mole-rats, namely *Bathyergus suillus*, *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *Cryptomys natalensis* and *Heliophobius argenteocinereus*. Spectral cone types and rods were assessed immunocytochemically with opsin-specific antibodies. All examined species have rod-dominated retinæ but possess a very high cone proportions ($\geq 10\%$). The rod nuclei possess the conventional architecture found in nearly all eukaryotic cells, with most heterochromatin situated at the nuclear periphery and euchromatin residing toward the nuclear interior, i.e., the arrangement that is typical for diurnal mammals and is not expected in animals adapted to subterranean darkness. The vast majority of cones were strongly S-opsin immunoreactive; the L-opsin immunoreactivity was much fainter, often barely detectable. Thus all bathyergid species examined feature an S-opsin dominance and low levels of L-opsin across the entire retina, a pattern that is unique among mammals. These photoreceptor properties are independent on whether the mole-rat is strictly subterranean or occasionally emerges above ground for foraging. Moreover, a comparative analysis clearly shows that subterranean life is compatible with very different spectral cone properties. Taken together, bathyergid photoreceptor mosaic is well suited to perceive daylight intensities and can hardly be considered an adaptation to subterranean vision. We speculate that S-cone dominance may be by-product of low thyroid hormone concentrations.

Keywords: photoreceptors, cones, rods, visual pigments, opsins, mammalian retina, visual system, subterranean mammals, vision

Klíčová slova: fotoreceptory, čípky, tyčinky, zrakové pigmenty, opsiny, savčí sítnice, zrakový systém, podzemní savci, zrak

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
I. ÚVOD	9
II. PŘEHLED LITERATURY	11
1. <i>Morfologie oka</i>	11
2. <i>Sítnice</i>	12
2.1. Evoluce čípkových opsinů a barevné vidění.....	12
2.2. Typy savčích čípků a jejich distribuce na sítnici.....	16
2.3. Struktura buněčného jádra tyčinek.....	19
3. <i>Sítnice podzemních hlodavců</i>	21
4. <i>Rypoši čeledi Bathyergidae</i>	25
III. CÍLE PRÁCE	27
IV. MATERIÁL A METODY	28
1. <i>Příprava materiálu a tkání</i>	28
2. <i>Imunocytochemie</i>	28
2.1. Opsiny na celých sítnicích.....	30
2.2. Opsiny na řezech.....	31
2.3. Jádra fotoreceptorů.....	31
V. VÝSLEDKY	32
1. <i>Obecné vlastnosti sítnice rypošovitých</i>	32
2. <i>Tyčinky</i>	32

3. Čípky.....	35
4. Hustoty čípků.....	41
VI. DISKUZE.....	44
1. Sítnice rypošovitých.....	45
2. Hustoty fotoreceptorů u rypošovitých.....	46
3. Tyčinky rypošovitých.....	46
4 Čípky rypošovitých.....	47
VII. SOUHRN.....	51
VIII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DAB	- diaminobenzidin
IgG	- imunoglobulin G
INL	- vnitřní jaderná vrstva sítnice
IPL	- vnitřní plexiformní vrstva sítnice
LWS	- citlivý ke dlouhým vlnovým délkám v rozsahu žlutá-červená (long-wavelength-sensitive)
L-	- viz LWS
ON	- optický nerv
ONL	- vnější jaderná vrstva sítnice
RPE	- pigmentový epitel
SBP	- protonovaná Schiffova báze retinalu
SWS1	- citlivý ke krátkým vlnovým délkám v rozsahu blízké UV oblasti a fialová (short-wavelength-sensitive 1)
SWS2	- citlivý ke krátkým vlnovým délkám v rozsahu fialovo-modrá (short-wavelength-sensitive 2)
S-	- viz SWS1

I. ÚVOD

Savci obývají nejrůznější biotopy a osvojili si různé životní styly spojené s různými světelnými podmínkami. Pro některé druhy je zrak dominantním smyslem, pro jiné má druhořadý význam. Je překvapivé, že téměř 300 druhů savců si osvojilo více či méně podzemní způsob života (Burda a kol. 1990; Nevo 1999; Bennett & Faulkes, 2000). Běžně se předpokládá, že zrakový systém se u podzemních hlodavců konvergentně vyvíjel v závislosti na jejich životě v trvalé tmě. Modelovým organismem pro studium zrakového systému podzemních savců je *Spalax ehrenbergi*, který má podkožní oči, jejichž atrofovaný optický aparát neumožňuje formování obrazu. Nicméně recentní studie zahrnující širší spektrum podzemních savčích druhů odkryly nepředpokládanou rozmanitost v utváření zrakového systému na nejrůznějších úrovních – proteinovou výbavou počínaje a designem centrálního zrakového systému konče. Společně tyto objevy svědčí o rozdílných zrakových schopnostech a adaptacích u různých podzemních hlodavců. Tyto studie tedy výrazně zpochybnily rozsáhle zastávaný názor, že zrak je pro podzemní živočichy postradatelným smyslem.

Rypoši čeledi Bathyergidae nereagují na světelné stimuly jako jsou pohybující se objekty nebo světelné záblesky (Oelschläger a kol. 2000). U tří druhů rypošovitých však byla prokázána schopnost rozeznat světlo a tmu (*Fukomys anselli* a *F. kafuensis*, Wegner a kol. 2006; *Heliophobius argenteocinereus*, Kott a kol. 2010). Fyziologické reakce sítnice na silné světelné záblesky a vyhýbání se světlu bylo popsáno u *Heterocephalus glaber* (Hetling a kol. 2005). Naproti tomu existuje řada anatomických a fyziologických dokladů naznačujících kompletní ztrátu zrakových schopností u slepce druhu *Spalax ehrenbergi*. V podkoží uložené oči s degenerovaným optickým aparátem postrádají schopnost tvorby obrazu na sítnici, celý zrakový systém je silně redukován. Experimentální data dokládají neschopnost slepce naučit se vyhýbat elektrošokům asociovaným se světelnými podněty (Rado a kol. 1992). Nicméně i *S. ehrenbergi* je schopen rozlišovat mezi světlem a tmou (Rado a kol. 1992).

Adaptivní význam zraku v podzemním prostředí zůstává nejasný. Zrakový systém slepců, rypošů a krteků není dobře uzpůsobený pro orientaci v otevřeném prostoru. Při vzácných nadzemních aktivitách (např. disperze, výpravy za příslušníky opačného pohlaví, výjimečné nadzemní výlety za potravou) se tedy mohou jen stěží řídit zrakem. Rovněž v uzavřených norách, kam neproniká světlo, se zdá být zrak nepoužitelným. Paradoxně se zdá, že uspořádání fotoreceptorů je u podzemních druhů adaptováno na podmínky denního

světla spíše než na tmou podzemního prostředí. Recentně bylo dokázáno, že reziduální zrak může podzemním savcům umožnit lokalizovat poškození tunelového systému, které umožní průnik světla do nory (Hetling a kol. 2005; Wegner a kol. 2006; Kott a kol. 2010). Světlo tak může indikovat přítomnost predátora nebo náhodně poškozený tunelový systém. Přehrazení osvětlených chodeb bylo popsáno u *Fukomys* a *Heliophobius* (Šumbera a kol. 2003; Šklíba a kol. 2007, 2009) a *Thomomys* (Werner a kol. 2005) a světlem vyprovokovaný útěk u *H. glaber* (Hetling a kol. 2005). Reziduální zrak tak může mít zásadní význam pro antipredační chování (Němec a kol. 2007, 2008; Kott a kol. 2010).

II. PŘEHLED LITERATURY

1. Morfologie oka

Oko je vstupní branou do zrakového systému a jeho vlastnosti determinují kvalitu informace, která je k dispozici k centrálnímu zpracování. Velikost oka určuje velikost obrazu na sítnici a vlastnosti optického aparátu (zahrnujícího rohovku a čočku) determinují kvalitu obrazu. Velikost oka se značně liší u různých druhů podzemních hlodavců. Jedním extrémem jsou miniaturní podkožní oči slepce druhu *Spalax ehrenbergi*, které ztratily schopnost formování obrazu a slouží pouze k detekci množství okolního světla pro fotoperiodickou percepci (review viz Nevo 1999). Oči krtek evropského *Talpa Europaea* jsou rovněž miniaturní, ale jsou umístěny na povrchu a normálně vyvinuty (Quilliam 1966). Na druhé straně spektra se nalézají oči velikostí odpovídající velikosti očí na povrchu žijících hlodavců (Howland a kol. 2004), které nalezneme u kurura *Spalacopus cyanus* (Peichl a kol. 2005). Většina podzemních hlodavců má normální optický aparát: oční víčka, rohovku, čočku, sklivec, duhovku s pupilárním otvorem a dobře vyvinutou sítnici vystýlající oční pohárek. To naznačuje normální schopnost formování obrazu na sítnici.

Velikost oka limituje velikost obrazu na sítnici. Malá velikost oka s sebou nese nízkou obrazovou kvalitu a zrakovou ostrost. Tuto limitaci s podzemními hlodavci sdílejí všichni mikrofalamičtí savci, např. někteří terestričtí hmyzožravci a hmyzožraví netopýři. Přímým následkem malé velikosti očí je malá pupila, která limituje tok fotonů na sítnici. Mimoto je čočka u mnoha podzemních druhů (ale ne u druhu *Heterocephalus glaber*) malá ve vztahu k velikosti oka (Peichl a kol. 2004; Nikitina a kol. 2004; Němec a kol. 2007). To je překvapivé, protože noční savci žijící na povrchu, jako jsou potkan nebo myš, mají relativně větší čočky k efektivnímu sbírání světla. Relativně malé čočky jsou charakteristické pro denní savce. Předpokládá se, že oči podzemních hlodavců jsou přizpůsobeny k využití malého množství dostupného světla v podzemním prostředí (stejně jako noční druhy). Jejich optické vlastnosti se tak zdají paradoxní, čemuž by odpovídalo také uspořádání fotoreceptorů (viz níže).

2. Sítnice

Sítnice je místem primární transdukce světelného signálu v signál nervový a zároveň místem primárního zpracování zrakové informace. K primárním transdukčním procesům dochází ve fotoreceptorech, k primárnímu zpracování zrakové informace v hlubších vrstvách sítnice. Fotoreceptory dělíme do dvou skupin: na tyčinky a čípky. Tyčinky jsou vysoce citlivé na světlo a využívají se ke scotopickému (nočnímu) vidění a vidění při malém množství světla. Čípky jsou méně citlivé na světlo a jsou používány k fotopickému (dennímu a barevnému) vidění. Za soumraku se zapojují tyčinky i čípky. Typy a hustota neuronů determinují charakteristiky zpracování zrakové informace. Optické rozlišení (dané velikostí oka) spolu s nervovým rozlišením (dané hustotou neuronů v sítnici) určují zrakovou ostrost.

2.1. Evoluce čípkových opsinů a barevné vidění

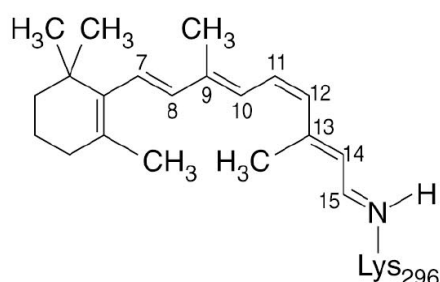
Barevné vidění umožňují čípky. Rozlišení barev vyžaduje dva a více různých typů fotoreceptorů se spektrálně rozdílnými opsiny. Mimo to musí být jejich signály odlišeny i při dalším zpracování, tj. signály z barevně-oponentních gangliových buněk sítnice musí být vedeny paralelně, aby mohly být porovnány ve zrakové kůře. Čípky se vyvíjely v různé spektrální typy s odlišnými zrakovými pigmenty posílající spektrální informaci ke vhodným gangliovým buňkám přes rozdílné interneurony (Jacobs a Rowe 2004).

Většina obratlovců má jeden typ rodopsinu v tyčinkách a čtyři různé typy opsinů lokalizovaných ve čtyřech různých spektrálních typech čípků, což potenciálně umožňuje tetrachromatické vidění. Všechny skupiny opsinů vznikly sérií genových duplikací z jediného původního opsinového genu. Čtyři skupiny obratlovcích čípkových opsinů jsou pojmenovány podle zkratk zhruba odrážejících maxima jejich spektrální citlivosti: SWS1 (short-wavelength-sensitive 1, blízké UV a fialová), SWS2 (short-wavelength-sensitive 2, fialová-modrá), RH2 (middle-wavelength-sensitive, zelená) a LWS (long-wavelength-sensitive, žlutá-červená) (Yokoyama 2000; Jacobs a Rowe 2004). Tyčinkový opsin RH1 je blízce příbuzný čípkovému opsinu RH2. Zdá se, že genová divergence do čtyř skupin opsinů se objevila v evoluci obratlovců velmi brzy. (review Vopalensky a Kozmik 2009)

Savci se vyvinuli z terapsidních plazů v Juře. Čípky plazů a ptáků jsou jak duální (exprimují dva typy opsinů), tak jednoduché a obsahují barevné tukové kapénky. Bezbarvé tukové kapénky nalezneme i u ptakořitných a vačnatců, nikoli však u placentálních savců; jedná se tedy bezesporu o ancestrální znak. Savci ztratili opsiny třídy RH2 a SWS2

a zůstaly jim pouze třídy LWS a SWS1 (Yokoyama 2000), což znamená, že většina savců má potenciálně dichromatické vidění. Jedním z vysvětlení může být, že druhohorní savci byli aktivní během noci a ztratili sofistikovaný tetrachromatický zrakový systém svých předků – jako noční živočichové ho nepotřebovali. U většiny savců se přesunula spektra SWS1 pigmentu k citlivosti v oblasti blízké UV a fialové nebo modré, to znamená do pozice ztraceného SWS2 pigmentu, a citlivost LWS pigmentu k zelené-červené oblasti v závislosti na druhu (Jacobs 1993). Tyto spektrální posuny jsou způsobeny záměnami opsinových aminokyselin, které jsou v kontaktu s 11-cis-retinalem. Pouze u starosvětských opic (Catarrhini) se znovu vyvinulo trichromatické vidění v důsledku duplikace genu pro LWS-opsin a vzniku dvou spektrálně odlišných typů LWS-opsinů (červená vs. zelená) (Jacobs 1993; Nathans 1999).

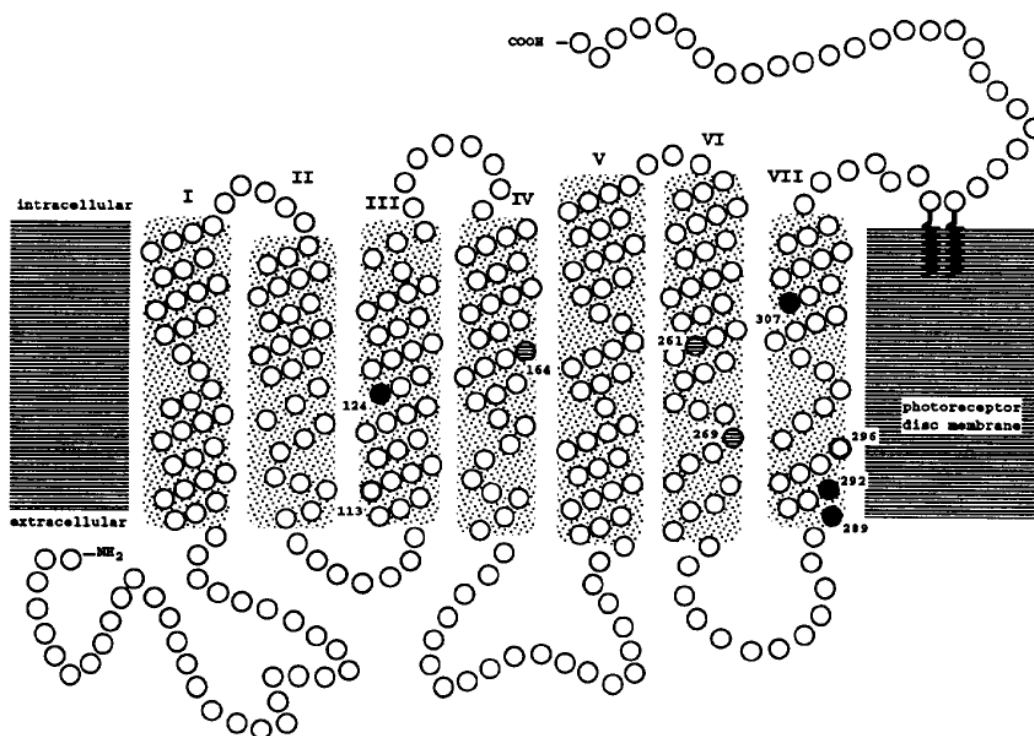
Zrakové pigmenty se skládají z proteinu, opsinu, a chromoforu (retinal, Obr. 1) jako foto-aktivovatelné molekuly. Spektrální citlivost pigmentu je dána aminokyselinovou sekvencí opsinu (Bowmaker a kol. 2006). Absorpční maximum retinalu v barevném zrakovém pigmentu je vyladěno interakcemi s proteinem (opsin), ke kterému je vázán. 11-cis-retinal je vázán protonovanou Schiffovou bází (PSB) ke specifickému Lysinovému zbytku (Lys296) opsinu. Sama PBS 11-cis-retinalu absorbuje v organických rozpouštědlech fotony o vlnové délce 440 nm. Absorpční maximum je také mírně ovlivněno teplotou (Ala-Laurila a kol. 2002), výrazně pak modifikacemi retinalu (Hárosi 1994) nebo vazbou aniontů (Kleinschmidt a Harosi 1992). Obratlovci mají absorpční maxima 360-635nm. V závislosti na protonaci Schiffovy báze retinalu je typicky pozorován posun ~ 60nm, což ale nestačí k vysvětlení posunu absorpčního maxima u zelených a červených zrakových pigmentů.



Obr.1. 11-cis-retinal

Různé skupiny obratlovců použily různé mechanismy k posunu vlnové délky v průběhu evoluce. Mutačními experimenty tedy našly několik cest ke stejnému absorpčnímu spektru. Například ptáci, plazi, obojživelníci, ryby a savci dospěli ke krátkovlnnému spektrálnímu vyladění opsinu různými cestami (Cowing 2002).

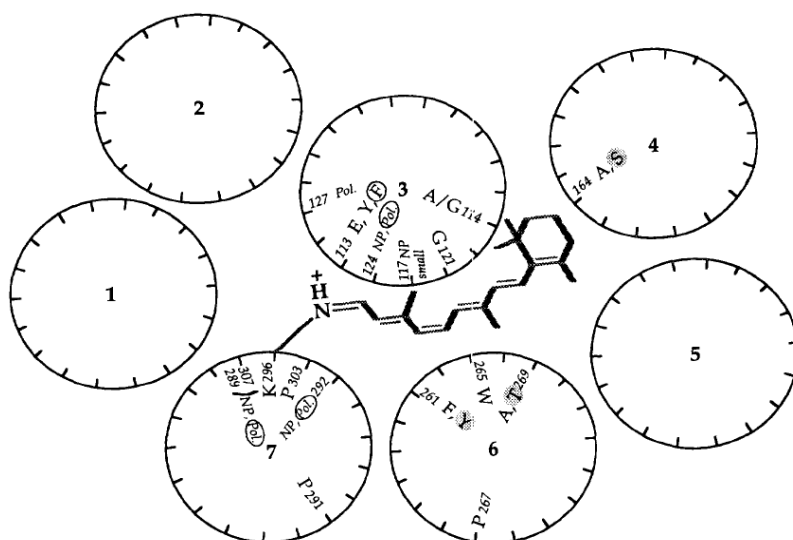
Aminokyselinové zbytky kontaktující Schiffovu bázi retinalu jsou konzervované uvnitř všech fylogenetických rodin opsinů, odlišují se pouze u SWS-1. Tyto zbytky obklopující Schiffovu bázi retinalu jsou esenciální pro stabilitu retinalu ve tmě (Janz a kol. 2003), mohou být zodpovědné za správné sbalení proteinu a stabilitu spíše než, že by měly aktivní fyziologickou funkci. Pomocí mutantních pigmentů byly identifikovány Glu113, jako primární párový ion retinalového PSB chromoforu (Nathans 1990, Obr. 2), stejně jako aminokyseliny, které jsou asociovány s opsinovým posunem zelená-k-modré a zelená-k-červené. Dva kyslíkové atomy v karboxylové skupině postranního řetězce Glu113 (α -helix III) stabilizují pozitivní náboj protonované Schiffovy báze, přenášející absorpční spektra do oblasti viditelného světla (Nathans 1990). Bezobratlí mají neprotonovanou Schiffovu bázi, která absorbuje kratší vlnové délky než protonovaná, tedy UV světlo namísto světla modrého. Nepotřebují polární zbytek na pozici 113 nebo 124, protože nemají kladný náboj, který by potřeboval stabilizovat. Mají na pozici párového iontu k SBP polární Tyr113 a na pozici 124 polární Ser (kromě UV-opsinu – nepolární Ala124). Obratlovci mají tři obrátky nad 113 (párový iont SBP chromoforu) v α -helixu III aminokyselinový zbytek 124 (pouze dvě obrátky nad SBP) konzervovaný nepolární Ala nebo Gly u opsinů mimo fialové skupiny, která má v této pozici polární Thr nebo Ser (Chang a kol. 1995).



Obr. 2. Diagram rodopsinu ukazující transmembránové domény, každé kolečko znázorňuje aminokyselinu. Zbytek 296 je lysin, který kovalentně váže chromofor a zbytek 113 je párovým iontem protonované Schiffovy báze chromoforu. Každé černé kolečko je zbytek účastnící se modrého posunu absorpčního spektra a šrafované kolečko jsou zbytky účastnící se červeného posunu (Převzato z Chang a kol. 1995).

U opsinového posunu zeleného zrakového pigmentu je 11-cis-retinal obklopen hlavně nepolárními zbytky (Gly90, Ala292 a Ala295). Nepolární zbytky mohou hrát roli omezováním torzních úhlů v retinalu v důsledku sterických faktorů. Výměnou za polárnější skupiny (Ser90, Ser292 a Ser295) v transmembránových α -helixech II a VII získáme modrý pigment. Polární zbytky mohou také přeskupit nebo stabilizovat molekuly vody, které představují okolí Schiffovy báze. Pro plně modrý posun absorpce pigmentu jsou nezbytné mutace α -helixu III (Ala117Gly a Glu122Leu) v opsinu, což způsobí slabý posun párového aniontu k Schiffově bázi a pomáhá ke stabilizaci distribuce náboje základního stavu (Lin a kol. 1998). Tato dielektrická stabilizace vede k redukci delokalizace elektronů a působí modrý-posun absorpce. Konverze lidského zeleného pigmentu k červeně-absorbujícímu pigmentu vyžaduje změnu sedmi aminokyselin (Asenjo a kol. 1994). U opsinu výměna tří konzervovaných nepolárních zbytků (Ala164, Phe261 a Ala296) hydroxyl-aminokyselinami vytvoří posun od zelené k červené.

S chromoforem mají interakce α -helixy III, VI, VII (Nathans 1990, Obr. 3). Chromofor je kovalentně vázán na Lys296. Aminokyselinové pozice 289 a 307 v α -helixu VII jsou umístěny ve dvou otáčkách α -helixu pod Lys 296 a tři otáčky nad ním- blízko protonované Schiffovy báze na konci chromoforu , který Lys296 kovalentně váže. Tyto pozice jsou blíže, než by se dalo předpokládat z vlastností α -helixu, stejně jako vysoce konzervovaný Pro291 u většiny opsinů na protější straně α -helixu naproti těmto dvěma zbytkům. To může vysvětlit smyčku v α -helixu (Ballesteros a Weistein 1992), přinášející tyto protější zbytky blíže k sobě. Opsiny absorbující dlouhé vlnové délky mají v těchto dvou pozicích nepolární aminokyseliny a opsiny absorbující krátké vlnové délky aminokyseliny s polárními řetězci, například obratlovčí LWS- opsin nepolární Ala289 a Val307, SWS1 opsin polární Thr289 a Cys307, rodopsin polární Thr289 a nepolární Ile307 (Chang a kol. 1995).



Obr. 3. Interakce retinalu s rodopsinem. Kruhy reprezentují transmembránové α -helixy rodopsinu, obklopující 11-cis-retinal. Chromofor je kovalentně navázán lysin (K296) sedmého α -helixu. Malé nevybarvené kruhy/ovály znázorňují aminokyselinové zbytky účastníci se modrého posunu absorpčního spektra a šrafované červeného (číslování je převzato z hovězího rodopsinu) (Převzato z Chang a kol. 1995).

2.2. Typy savčích čípků a jejich distribuce na sítnici

U ptáků a studenokrevných obratlovců jsou čípkové morfologicky dobře rozlišitelné od tyčinek, jednotlivé typy čípků pak mohou být rozeznány podle barvy tukových kapének v čípcích přítomných. Naproti tomu u savců byly fotoreceptory dlouhou dobu považovány za uniformní a těžko rozlišitelné na podtypy. U některých druhů lze čípkové morfologicky odlišit od tyčinek, u jiných jsou odlišitelné jen velmi špatně. To platí především pro savce

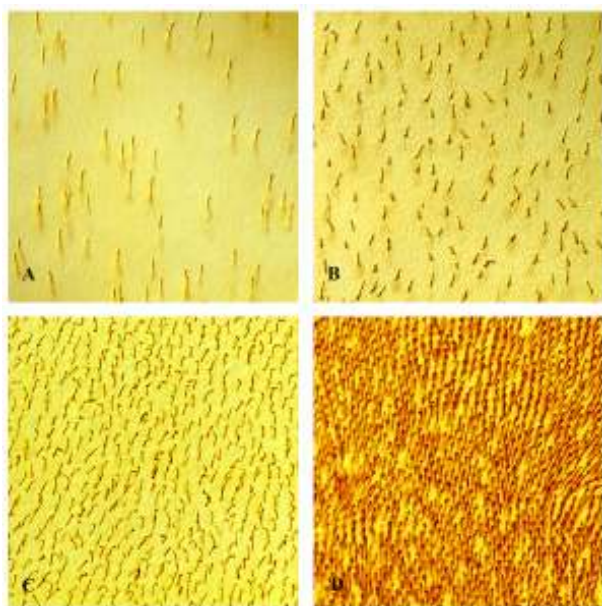
s noční aktivitou. Z tohoto důvodu zůstávaly čípky u savců s noční aktivitou dlouho nerozpoznány a tito savci byli považováni za barvoslepé. Dnes dokážeme jednotlivé typy fotoreceptorů jednoznačně rozlišit pomocí specifických protilátek. Studie využívající imunohisto-chemické metody ukázaly nepředpokládanou variabilitu spektrálních a morfologických typů fotoreceptorů a topografických vzorů jejich distribuce na sítnicích různých druhů (review viz Ahnelt a Kolb 2000; Peichl a kol. 2005).

Většina savců, mimo primáty, má dvoubarevné (dichromatické) vidění založené na dvou typech čípků se spektrálně odlišnými zrakovými pigmenty: čípky citlivé na světlo krátkých vlnových délek (SWS-čípky, blízké UV – modrá) a světlo dlouhých vlnových délek (LWS-čípky, zelená-žlutá). U různých druhů živočichů byly nalezeny prokazatelné odlišnosti v poměru hustoty čípků a tyčinek v rozsahu od 1:200 u většiny nočních a 20:1 u několika denních druhů. Tento poměr zhruba koreluje s množstvím světla v době, kdy jsou živočichové aktivní. Obecně mají noční druhy mezi fotoreceptory méně čípků (<1-3%), denní druhy mají 8-95% čípků a soumravné druhy mají střední poměr (2-10%) čípků (Ahnelt a Kolb 2000; Peichl a kol. 2005). Paradoxně tedy i u většiny denních savců množství tyčinek značně převyšuje počet čípků (Obr. 4).

Jedním z důvodů pro uchování alespoň řídké populace čípků u každého druhu je uspořádání savčí sítnice. Zpracování signálu je ve vnější sítnici přísně odděleno. Na tyčinky navazují tyčinkové bipolární buňky a na čípky čípkové bipolární buňky. Ve vnitřní sítnici čípkové bipolární buňky tvoří synapse s gangliovými buňkami (výstup buněk ze sítnice). Tyčinkové bipolární buňky nejsou přímo spojeny s gangliovými buňkami, spojení zprostředkovávají specializované AII amakrinní buňky ve vnitřní sítnici (Peichl a kol. 2005). Kdyby schéma čípkového systému nebylo takovéto, tyčinkový signál by nedosáhl gangliových buněk (Wässle 2004).

U některých živočichů se podíl spektrálních typů čípků a jejich distribuce na sítnici odchyluje od základního savčího vzoru, v extrémních případech se setkáváme s úplnou absencí některého typu čípků (Peichl a kol. 2005).

V závislosti na druhu může mít spektrální citlivost LWS-čípkových pigmentů (opsinů) vrchol v zelené, žluté nebo oranžové a u SWS-čípkových opsinů v modré, fialové nebo UV oblasti.



Obr. 4. Fotoreceptorová mozaika na sítnicích druhů aktivních za různých světelných podmínek. Na sítnicích jsou nabarvené vnější segmenty čípků a nenabarvená místa mezi nimi tvoří tyčinky. U sítnic je zachován poměr velikostí. A) Striktně noční *Cricetomys gambianus* s velice malým množstvím čípků. B) Vlk (*Canis lupus*) aktivní v noci a za soumraku má vyšší poměr čípků. C) Muflon (*Ovis musimon*), který je aktivní ve dne a za soumraku. D) Striktně denní tana severní (*Tupaia belangeri*), která má okolo 95% čípků a pouze přibližně 5% tyčinek (převzato z Peichl a kol. 2005).

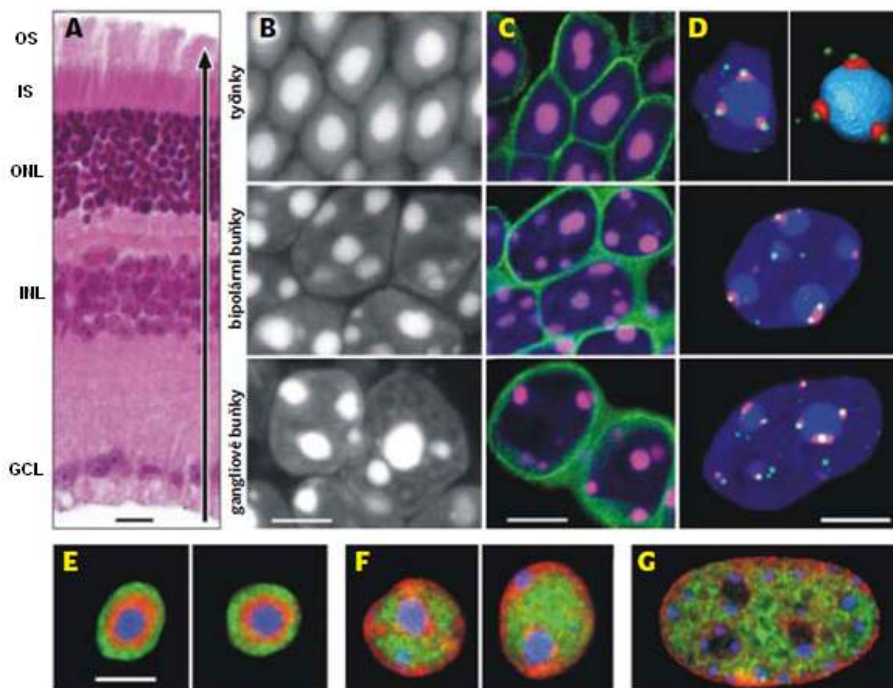
Obvykle je v jednom čípku exprimován jen jeden typ opsinu. U některých druhů však byly popsány tzv. duální čípky, které koexprimují oba typy opsinů (Szél a kol. 2000).

U některých hlodavců najdeme dorzo-ventrální gradient SWS- a LWS- čípků. Duální čípky byly nalezeny na přechodu mezi horní (LWS) a dolní (SWS) částí sítnice například u králíka, morčete nebo myši, kde tvoří téměř horizontální linie procházející přes centrální část sítnice (Röhlich a kol. 1994b). Duální čípky byly rovněž nalezeny u některých podzemních hlodavců (viz níže).

Koexpresi opsinů často nalzáme u hlodavců během ontogentického vývoje sítnice. U myši (Szél a kol. 1993) se nejdříve objeví SWS-čípky v dorso-ventrálním gradientu a později LWS-čípky, které vznikají transdiferenciací z SWS-čípků. Další příklad transdiferenciace nalezneme u potkana, u kterého se při vývoji sítnice nejprve objeví SWS-čípky, které pak začínají exprimovat i LWS-opsin (duální) a nakonec přestávají exprimovat SWS-opsin. Dospělí potkani mají extrémně málo SWS-čípků (Szél a kol. 1993).

2.3. Struktura buněčného jádra tyčinek

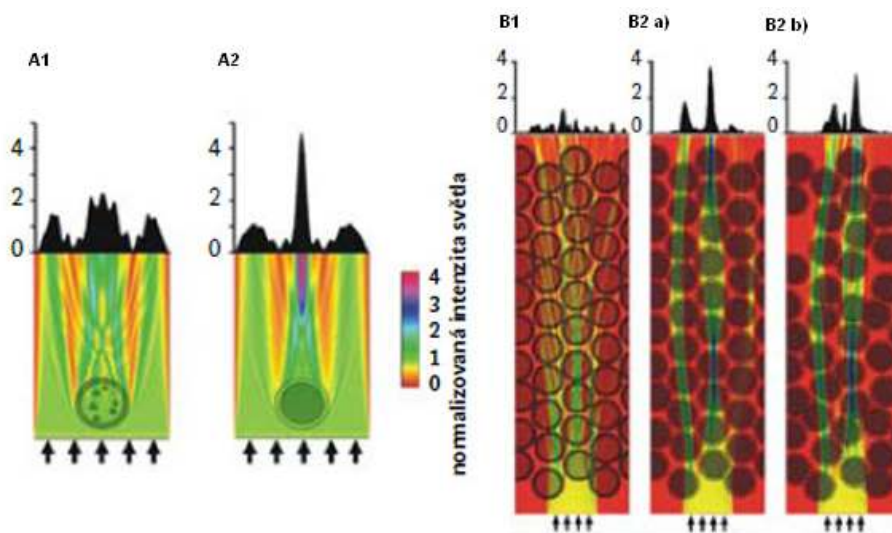
U buněk sítnice nalezneme běžné uspořádání buněčných jader, kde heterochromatin tvoří několik chromocenter, která přiléhají k okraji jádra nebo jadérku a euchromatin (tudíž většina transkribovaných genů) je lokalizován uvnitř jádra (Kosak a kol. 2007; Misteli 2007). V jádrech tyčinek myši byla ale nalezena přesně opačná architektura. Heterochromatin tvoří jedno velké chromocentrum ve středu jádra a euchromatin se nachází na jeho periferii (obr. 5). Na periferii jádra se tedy nachází aktivně přepisované geny a nalezneme zde aparát nutný k jejich transkripci, primární transkripty i aparát k jejich sestříhu. (Solvei a kol. 2009). V jádrech tyčinek novorozených myši nalezneme normální strukturu jader a až během postnatálního vývoje se v nich heterochromatin přeskupuje do středu jádra. (Solvei a kol. 2009).



Obr. 5. A) Řez sítnicí myši, OS/IS- vnější (outer) a vnitřní (inner) segmenty fotoreceptorů, ONL- vnější nukleární vrstvy, OPL- vnější plexiformní vrstva, INL- vnitřní nukleární vrstva, IPL- vnitřní plexiformní vrstva, GCL- vrstva gangliových buněk. B-D Stavba jader tyčinek, bipolárních a gangliových buněk. B) Dapi barvení se světlými chromocentry ve středu jader tyčinek, u bipolárních a gangliových buněk je heterochromatin na periferii jader. C) Fluorescenčně značené jádro (modrá), chromocentra (červená) a jaderný obal (zelená). D) Vzájemná poloha centromer (červená), telomer (zelená) a chromocenter. Nahoře vpravo 3D rekonstrukce jádra tyčinek. E-F) Distribuce různých typů chromatinu (euchromatin zeleně, heterochromatin červeně a modře chromocentra, pericentrický heterochromatin) v jádrech tyčinek E), gangliových buněk F a fibroblastů G). (převzato z Solvei a kol. 2009)

Rozsáhlá srovnávací analýza ukázala, že architektura jader tyčinek koreluje se způsobem života. Invertovanou strukturu jader tyčinek nalezneme u nočních savců, u denních jsou organizována běžným způsobem. Struktura jader tyčinek koreluje s dalšími adaptacemi na noční vidění, jako je podíl čípků k tyčinkám a absolutní hustota tyčinek (viz kapitola 2.2.). (Solvei a kol. 2009)

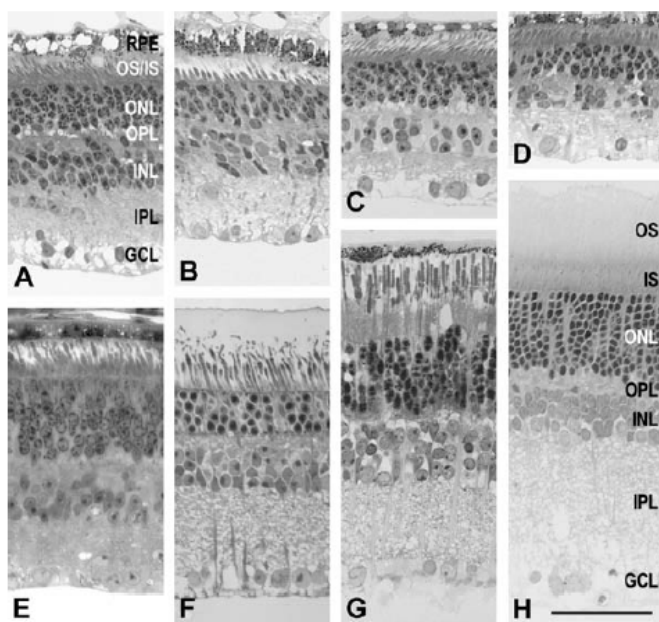
Optické experimenty a počítačové simulace ukazují, že invertované uspořádání jader tyčinek zlepšuje přenos světla přes vnější jadernou vrstvu sítnice. Heterochromatin ve středu jader má vyšší index lomu než euchromatin na jejich periferii a chová se jako konvexní čočka (spojka), která soustředí procházející světlo na vnitřní segmenty tyčinek (Solvei a kol. 2009). Noční savci mají větší hustotu tyčinek než denní a jádra tyčinek tvoří více vrstev (Sterling 2003; Williams a Moody 2003). Jednotlivá jádra jsou organizována nad sebou do sloupců a díky invertované struktuře jader u nočních živočichů dochází k výrazně nižšímu rozptylu, světlo se mezi sousedními sloupci nemísí (Obr. 6, Solvei a kol. 2009).



Obr. 6. Optické vlastnosti jader tyčinek savčí sítnice. Průchod světla A) jedním jádrem, B) sloupcem jader s 1) konvenční organizací, 2) s invertovanou organizací chromatinu, a) pravidelným sloupcem jader, b) s mírně nepravidelným sloupcem jader. Šípkami je značen směr světla. (převzato z Solvei a kol. 2009)

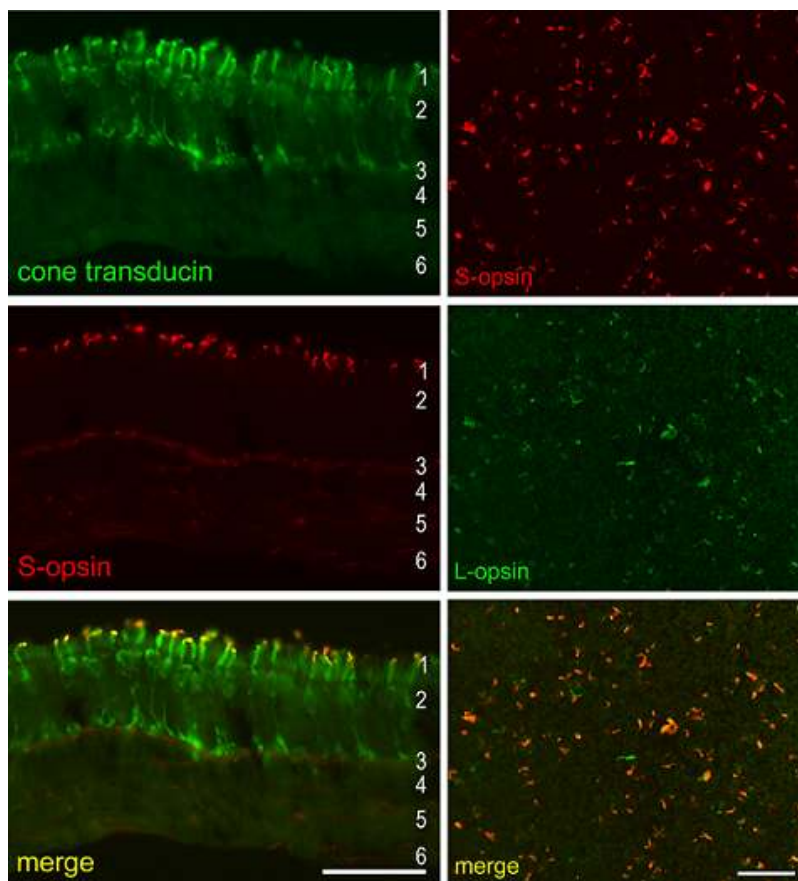
3. Sítnice podzemních hlodavců

Sítnice je tenká vrstva fotoreceptorů, která zevnitř vystýlá oční pohárek. U podzemních hlodavců zůstala zachována morfologie i laminace sítnice, ale tloušťka jednotlivých vrstev se u různých druhů velmi liší (Obr. 6), což ukazuje na rozdílné schopnosti zpracování zrakové informace. Šířka sítnice je dána tloušťkou vnější nukleární vrstvy (ONL), která obsahuje těla fotoreceptorů. Vnější a vnitřní segmenty fotoreceptorů mají menší průměr než jejich těla, takže vyšší hustota vnějších segmentů vyžaduje víc řad těl v ONL. Například v sítnici potkana jsou těla fotoreceptorů uspořádána přibližně v deseti řadách (Obr. 7). Sítnice podzemních hlodavců má tenčí ONL, což ukazuje na nižší hustotu fotoreceptorů. U podzemních hlodavců mají fotoreceptory větší průměr vnějších segmentů fotoreceptorů než například potkana. Hustota fotoreceptorů je proto u podzemních hlodavců nižší: 100 000-150 000/mm² u *F. anelli* a *F. mechowii* (Peichl a kol. 2004), 160 000-224 000/mm² u *Spalacopus cyanus* (Peichl a kol. 2005) a 70 000-125 000/mm² u *Thomomys bottae* (Williams a kol. 2005). Pro srovnání hustota fotoreceptorů u myši domácí je 450 000/mm² (Jeon a kol. 1998).



Obr. 7. Řezy sítnicí nabarvené toluidinovou modří. A) *Cryptomys hottentotus*; B) *Heterocephalus Glaber*; C) *Georychus capensis*; D) *Bathyergus suillus*; E) *Fukomys anelli*; F) *Geomys sp.*; G) *Spalacopus cyanus*; H) *Rattus norvegicus*. U řezů je zachován poměr velikostí. Měřítka na obrázku H má 50µm. RPE- pigmentové epithelium, OS/IS- vnější (outer) a vnitřní (inner) segmenty fotoreceptorů, ONL- vnější nukleární vrstvy, OPL- vnější plexiformní vrstva, INL- vnitřní nukleární vrstva, IPL- vnitřní plexiformní vrstva, GCL- vrstva gangliových buněk. (převzato z Němec a kol. 2007)

Spalax ehrenbergi má atrofované podkožní oči, sítnice je však organizována normálně (Sanyal a kol. 1990; Cernuda-Cernuda a kol. 2002). Tyčinky exprimují rhodopsin (Cernuda-Cernuda a kol. 2002). Čípky se morfologicky neodlišují od tyčinek a obsahují funkční LWS-opsin, SWS-opsin je nefunkční (David-Gray a kol. 2002). Rypoši čeledi Bathyergidae (Obr. 9) mají rovněž normálně stratifikovanou sítnici. Vrstva fotoreceptorů je cca z 90% tvořena tyčinkami, 10% čípky (Peichl a kol. 2004). Poměr čípků je tedy neočekávaně vysoký. U *F. anselli* téměř všechny čípky exprimují SWS-opsin. Přibližně 70% SWS-čípků koexprimuje také malé množství LWS-opsinu, ale můžeme nalézt pouze velmi malé množství čípků exprimujících pouze LWS-opsin. Hustoty čípků u *F. anselli* jsou 8 000-15 000/mm² (Obr. 8), podobné hodnoty byly nalezeny i u *F. mechowii* a *Heterocephalus glaber*, rovněž u těchto druhů tvoří čípky okolo 10% fotoreceptorů. U kurura (*Spalacopus cyanus*, Octodontidae) tvoří čípky také asi 10% fotoreceptorů, ale jejich hustota je vyšší (10 000-30 000/mm²). Hustota čípků navíc u tohoto druhu vykazuje na sítnici centro-periferní gradient. Na rozdíl od afrických rypošů má kururo konvenční uspořádání čípků. Většina čípků exprimuje LWS-opsin a menšina SWS-opsin, koexprese opsinů zde nebyla demonstrována. LWS-čípky jsou citlivé na zelenou a SWS-čípky na UV oblast. Toto spektrální vyladění je velice podobné příbuznému, na povrchu žijícímu, osmákovi degu (*Octodon degus*) a může být zvláštností skupiny octodontidae. Denní degu má okolo 30% čípků, ale noční obyvatelé povrchu *Octodon bridgesi* a *O. lunatus* mají pouze 2% čípků (Peichl a kol. 2005). Pytloš druhu *Thomomys bottae* (Geomyidae) má ještě vyšší podíl čípků, okolo 26% (Williams a kol. 2005). Nacházíme u něj UV-senzitivní SWS-opsin a na zelenou senzitivní LWS-opsin, ale vzory jejich distribuce jsou opět rozdílné. Všechny čípky obsahují SWS-opsin a LWS-opsin je koexprimován prakticky ve všech čípcích dorzální poloviny sítnice, zatímco úplně chybí ve ventrální polovině sítnice (Williams a kol. 2005). Zajímavé je srovnání s krtkem evropským (*Talpa europaea*, insectivora) má také okolo 10% čípků. V dorzální sítnici se nachází asi 2x více LWS-čípků než SWS-čípků a ve ventrální části sítnice je jejich poměr obrácený. Nalezneme u něj populace koexprimující oba typy opsinů (Glösmann a kol. 1999).



Obr. 8. Identifikace čípků u rypoše druhu *Fukomys anelli*. Levý sloupec: vertikální řezy sítnicí. (Nahoře) Čípky značené protilátkou proti transducinu (A1.1). (Uprostřed) SWS-čípky značené protilátkou proti SWS-opsinu (JH 455). (Dole) sloučení obou obrázků. Měřitko 50 μ m. Pravý sloupec: dvojitě značení SWS čípků (protilátka OS-2) a LWS čípků (antiserum JH 492) na sítnicích montovaných na plocho (retinal wholemounts). (Nahoře) distribuce SWS čípků, (Uprostřed) distribuce LWS čípků, (Dole) sloučení obou obrázků. Měřitko 20 μ m. Zkratky: L-opsin= LWS opsin, S-opsin= SWS-opsin. (Převzato z Peichl a kol. 2004)

Uspořádání čípků u podzemních druhů je tedy značně variabilní. Pohybuje se od běžné směsice LWS- a SWS-čípků k dominanci SWS-čípků a koexpresi obou typů opsinů v duálních čípcích. To spíše odpovídá představě druhově specifické adaptace na různé požadavky prostředí než představě o rozsáhlé konvergentní adaptaci na společný nedostatek světla pod povrchem. Je dost možné, že vzácné a krátké epizody povrchové aktivity mohou mít formující vliv na hustotu a distribuci fotoreceptorů. Alternativně, různé uspořádání fotoreceptorů může být historickou daností zděděnou po předcích s povrchovou aktivitou. Do jaké míry je tedy uspořádání mozaiky fotoreceptorů adaptivní, je stále otevřenou otázkou.

Vysoký poměr čípků (10-25%) činí tyto podzemní hlodavce podobnějšími denním

než nočním na povrchu žijícím savcům. Pro srovnání například u laboratorního potkana tvoří čípky jen asi 1% fotoreceptorů. Maximální hustota čípků se mezi druhy značně liší, pohybuje se od 30 000/mm² u druhů *T. bottae* a *S. cyanus* po 15 000/mm² u afrických rypošů. Hustota čípků u rypošů je velmi podobná hustotě čípků u myši (cca 12 500/mm²) (Jeon a kol. 1998). Překvapivým zjištěním byl počet tyčinek u těchto druhů, který je mnohem menší než u nočních obyvatel povrchu. I přes podobné absolutní hustoty tvoří tedy čípky vyšší procento fotoreceptorů. Hustota tyčinek se pohybuje okolo 440 000/mm² u myši (Jeon a kol. 2008), okolo 220 000/mm² u kurura (Peichl a kol. 2005), 100 000-150 000/mm² u rodu *Cryptomys* (Peichl a kol. 2004) a *Talpa europaea* (Glösmann a kol. 2008) a pouze 55 000-100 000/mm² u *Thomomys bottae* (Williams a kol. 2005). Jak již bylo zmíněno důvodem malých hustot tyčinek je fakt, že jednotlivé tyčinky jsou větší. V porovnání s nočními živočichy mají tedy podzemní hlodavci větší, ale méně hustě uspořádané tyčinky, přesto že by se daly u obou skupin předpokládat podobné adaptace k vidění při nízké intenzitě světla. Není jasné, zda je vyšší citlivosti sítnice na světlo lépe dosaženo nižší hustotou větších tyčinek s potenciálně vyšším obsahem pigmentu na buňku, nebo vyšší hustotou menších tyčinek dovolující vyšší konvergenci na postsynaptických neuronech, a tedy zaručující lepší poměr signálu k šumu. Předpokládá se, že délka a průměr vnějších segmentů tyčinek je spolehlivým ukazatelem obsahu zrakových pigmentů. Můžeme tedy konstatovat, že tyčinky u různých podzemních druhů obsahují různé množství pigmentu. U podzemních druhů mají tyčinky široké vnější segmenty, které se výrazně liší délkou (Němec a kol. 2007). To odpovídá hypotézám, že rypoši používají tyčinky ne k vidění pod zemí, ale k detekci děr v chodbovém systému jako antipredační systém (Němec a kol. 2007, Kott a kol. 2010). Tyčinky jsou krátké u rypošů čeledi bathyergidae, dlouhé u *Geomys sp.* a *S. cyanus* (Němec a kol. 2007).

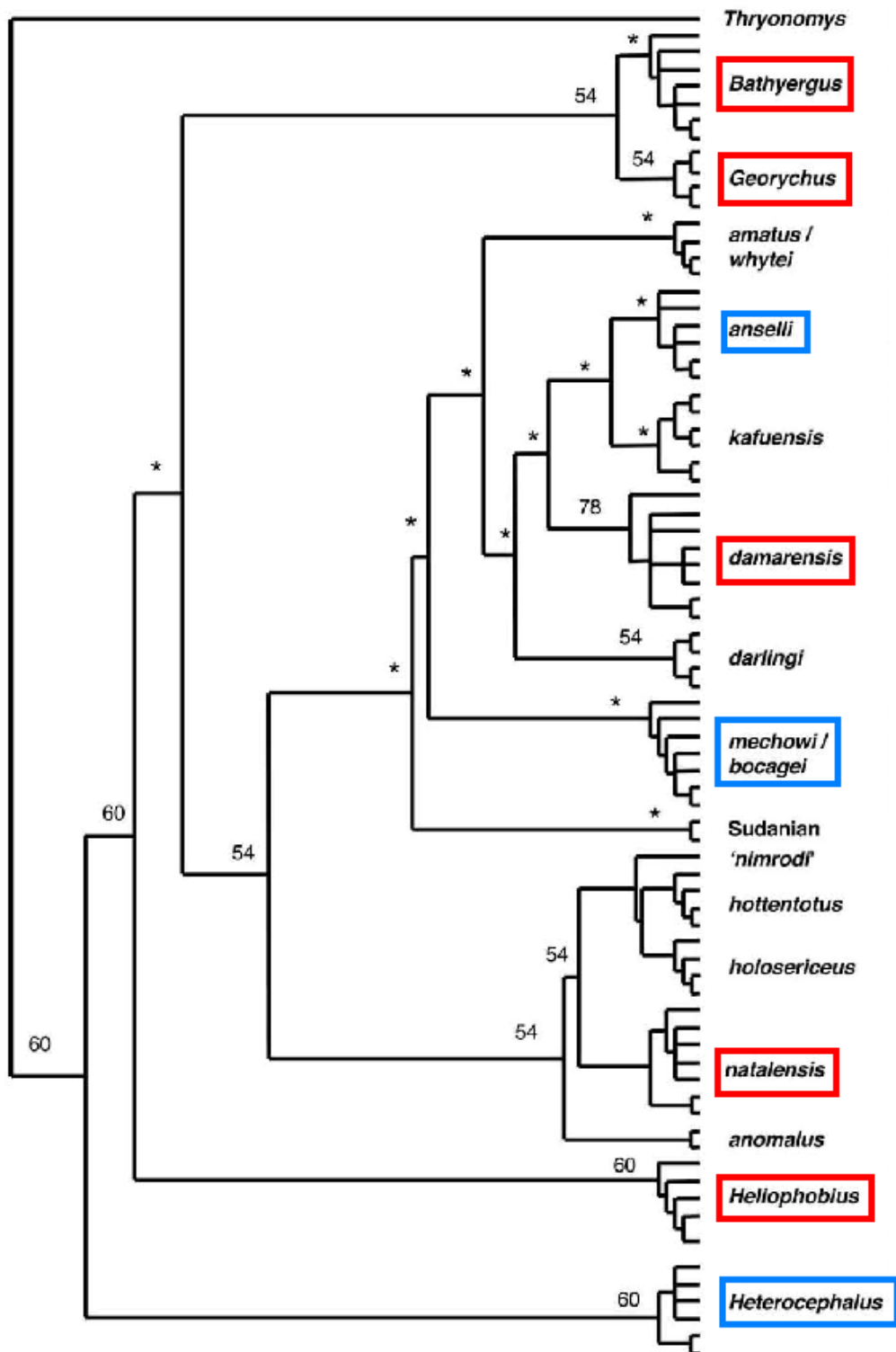
SWS-opsin *S. cyanus* a *T. bottae* má absorpční maximum blízko 365 nm (UV) a LWS-opsin blízko 505 nm (zelená) (Peichl a kol. 2005, Williams a kol. 2005). UV-senzitivní SWS-čípky byly nalezeny u mnoha hlodavčích druhů, ale většina ostatních savců má SWS-čípky citlivé na modrou oblast spektra (Peichl 2005). U *S. ehrenbergi* pravděpodobně souvisí s podkožním umístěním očí, světlo proniká k oku dobře prokrvenými tkáněmi a na hemoglobin bohaté prostředí může posouvat vlnovou délku světla směrem k červené (David-Gray a kol. 1998). U Bathyergidů není známo přesné spektrální vyladění čípkových opsinů. Podle behaviorálních studií se zdá, že S-opsin Bathyergidů je citlivý na modrou-UV oblast (*F. mechowii* a *H. argenteocinereus*, Kott a kol. 2010).

4. Rypoši čeledi Bathyergidae

Rypoši čeledi Bathyergidae jsou striktně podzemní malí až středně velcí hlodavci (80-280mm) žijící v sub-Saharské Africe. Žijí v systémech podzemních chodeb a komor izolovaných od okolního prostředí krtinami (Nevo a kol. 1979, Bennet a Faulkes 2000). Živí se téměř výhradně podzemními zásobními orgány rostlin, ze kterých získávají i vodu (nepijí). Nejstarší fosilní nálezy jejich chodeb pochází již z časného miocénu (jsou staré přibližně 25 milionů let, Lavocat 1973, 1978). Jejich fylogenetický strom naleznete na obrázku 8.

U této skupiny najdeme velice rozsáhlé spektrum sociálních systémů (Javis a Bennett 1990, 1991, Bennett a Faulkes 2000, Burda a kol. 2000). Druhy *Heliophobius argenteocinereus*, *Georychuscapensis* a *Bathyergus suillus* jsou solitérní. Ostatní druhy vykazují různou míru sociality, druhy *Fukomys anelli*, *Fukomys mechowii*, *Fukomys damarensis* a *Heterocephalus glaber* jsou některými autory považovány za eusociální.

Většina druhů je striktně podzemních, druhy *Georychuscapensis* a *Bathyergus suillus* však vykazují vyšší míru nadzemní aktivity (příležitostně využívají nadzemních potravních zdrojů nalezených v bezprostředním okolí jejich nor (Bennet a Faulkes 2000; Bennett, personální sdělení). Tomu také odpovídá relativně vysoký počet myelinizovaných nervových vláken v jejich optickém nervu (Němec a kol. 2007).



Obr. 8. Fylogenetický strom rypošovitých. Modře jsou označeny druhy, u kterých byly fotoreceptory již zkoumány (Pechl a kol. 2004), červeně jsou označeny druhy, které zkoumá tato práce. (Kladogram převzat z Ingram a kol. 2004)

III. CÍLE PRÁCE

Cílem předložené práce je rozšířit naše znalosti o distribuci a mezidruhové variabilitě fotoreceptorů u rypošů čeledi Bathyergidae.

Specifické cíle:

1) Popsat distribuci, hustotu a poměr tyčinek, SWS- a LWS-čípků u pěti druhů rypošů a testovat zda se mozaika fotoreceptorů liší u druhů striktně podzemních druhů (*Fukomys damarensis*, *Cryptomys natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus*) a druhů, které příležitostně využívají nadzemní potravní zdroje (*Georychus capensis*, *Bathyergus suillus*).

Testovaná hypotéza:

H0: Vysoká hustota a unikátní dominance S-čípků je adaptací na podzemní způsob života.

H1: Vysoká hustota a unikátní dominance S-čípků je byla zděděna od společného předky rypošů čeledi Bathyergidae nebo kauzálně souvisí s jiným faktorem než je relativní míra přizpůsobení k podzemnímu životu.

2) U sedmi druhů rypošů čeledi Bathyergidae (*Bathyergus suillus*, *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *Cryptomys hottentotus*, *C. natalensis*, *C. pretoriae* a *Heliophobius argenteocinereus*) popsat organizaci chromatinu v jádrech tyčinek.

Testovaná hypotéza:

H0: Chromatin jader tyčinek je invertortovaný podobně jako u savců s noční aktivitou, tyčinky jsou tedy adaptovány na extrémně nízké intenzity světla.

H1: Chromatin jader tyčinek má konvenční organizaci, adaptace na nízké intenzity světla tedy není přítomna.

IV. MATERIÁL A METODY

1. Příprava materiálu a tkání

Pro prováděnou imunocytochemii byly použity sítnice druhů *Bathyergus suillus*, *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *Cryptomys natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus*. Tato zvířata byla transkraniálně perfundována 4% paraformaldehydem v 0,1M fosfátovém pufru (PB, pH 7,4) za účelem jiných neuroanatomických studií.

Pro topografickou orientaci byly oči před preparací označeny na dorzální straně chirurgickým uzlem. Z očního pohárku byly vyjmuty sítnice, separované od pigmentového epitelu tak, aby nebyly poškozené vnější segmenty fotoreceptorů. Některé sítnice musely být odbarveny od zbytků pigmentu 25-55 minutami v odbarvovacím roztoku (10ml 1,8% NaCl, 4ml H₂O₂, 1ml H₂O, 1 kapka NH₃). Za účelem kryoprotekce byly celé sítnice prosyceny sérií 10%, 20% a 30% sacharózy v PB (výměna po 15 minutách) a na řezání převedeny do tkáňového mrazicího média (tissue freezing medium, Leica Microsystems Nussloch GmbH), na kryostatu nařezány podél dorzoventrální osy na řezy o tloušťce 14µm. Řezy byly po několika namontovány na podložních sklech SuperFrost Plus.

2. Imunocytochemie

Pro značení opsinů byly použity afinitně přečištěné králičí protilátky JH455 (proti lidskému C-koncovému S-opsinovému epitopu) a JH492 (proti lidskému C-koncovému M/L-opsinovému epitopu), které laskavě poskytnul J.Nathans (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore; Wang a kol. 1992). Na dvojitě barvení opsinů byla použita komerčně dostupná kozí protilátka sc14363 (proti 20 aminokyselinovému lidskému N-koncovému S-opsinovému epitopu, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz) a JH492. U všech těchto protilátek bylo prokázáno, že reagují se svými savčími homology a byly již dříve použity k identifikaci fotoreceptorových typů u mnoha živočišných druhů (Peichl a kol. 2005; Williams, Calderon a Jacobs 2005; Glösmann a kol. 2008). Tyčinky byly značeny myší monoklonální protilátkou rho4D2 (proti telecímu rodopsinu), kterou laskavě poskytl R. S. Molday (University of British Columbia, Vancouver; Hicks a Molday 1986). Vazebná místa byla zviditelněna pomocí sekundárních protilátek Alexa 488-vázaná (Molekular Probes, Eugene) nebo Cy5-vázaná (Jackson ImmunoResearch

Laboratories, West Grove) na oslí Imunoglobulin G (Tab. 3). Imunocytochemie se držela dříve popsaných protokolů (Peichl a kol. 2004).

Pro vyhodnocení poměru množství S- a L-čipků a určení jejich hustoty, byl použit mikroskop Olympus BX51 a program AnalySYS^D (2001, Olympus Biosystems GmbH). Pro vyhodnocení DAB reakčního produktu byly hodnoceny ve světlém poli, pro Alexa 488 a Cy5 (Jackson Laboratories) je nutné fluorescenční osvětlení se standardní soupravou filtrů pro fluorescenční vizualizaci. Neznačené fotoreceptory byly identifikovány pomocí Nomarského kontrastu.

Tab. 1: preinkubační médium (NGS/NDS)

NGS/NDS	10%
BSA	1%
Triton-X-100	0,50%
0,1M PB, pH 7,4	
NaN ₃	0,05%

Tab. 2: inkubační médium (NGS/NDS)

NGS/NDS	3%
BSA	1%
Triton-X-100	0,50%
0,1M PB, pH 7,4	
NaN ₃	0,05%

Tab. 3: použité protilátky

1'protilátky	ředění
S-opsin	
sc 14363	1:500
JH455	1:5000
L-opsin	
JH 492	1:2000
rodopsin	
rho 4D2	1:500

2'protilátky	ředění
Alexa 488	1:500
Cy5	1:1000

2.1. Opsiny na celých sítnicích

Pro barvení celých sítnic byly tkáně opakovaně (3x) šokově zmražené a rozmražené pro penetraci membrány kvůli zlepšení průniku protilátek. Následovala 1 hodina v preinkubačním médiu (Tab. 1) a 16 hodin v inkubačním médiu (Tab. 2) s primárními protilátkami (Tab. 3) při pokojové teplotě. Poté byly sítnice omývány 2 hodiny v PB, výměna po 15 minutách. Vazebná místa byla vizualizována pomocí sekundárních protilátek (Tab. 3), inkubace 1 hodinu ve tmě a 2 hodiny omývání PB ve tmě při pokojové teplotě. Vzorky byly přeneseny na podložní sklo fotoreceptorovou vrstvou nahoru a zamontovány pod krycí skličko v mediu Aqua Poly/Mount (Polysciences, Warrington).

Králičí protilátky JH455 a JH492 byly také použity k avidin-biotinovému značení využívajícímu diaminobenzidin (DAB) jako chromogen. Sítnice byly 3x šokově zmrazeny a rozmrazeny, 15 minut omývány v PB a zablokovány 1 hodinou v preinkubačním médiu (Tab. 1). Následovalo 16 hodin v inkubačním médiu (Tab. 2) s primární protilátkou při 6°C. Po omytí v PBS/0.25% Triton X-100 byly sítnice inkubovány v biotinylované kozí proti-králičí IgG (1:300, Sigma) naředěné v inkubačním médiu (Tab. 2, 2 hod, pokojová teplota), omyty v PBS/0.25% Triton X-100 a 2 hodiny inkubovány v ABC kitu (Vector

Laboratories, Burlingame, CA) při pokojové teplotě. Peroxidáza byla vizualizovaná pomocí DAB / H₂O₂ (0,015% / 0,005%) v PBS. Sítnice byly opláchnuty v PBS, rozložené na podložní sklo fotoreceptory směrem nahoru a zamontovány pod krycí sklíčko ve Vectashield mounting mediu (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

2.2. Opsiny na řezech

Řezy sítnice byly 2x omyty PB (0,1M, pH 7,4) a 1 hodinu inkubovány v preinkubačním médiu (Tab. 1), a poté 1 hodinu v inkubačním médiu (Tab. 2) s primární protilátkou (Tab. 3) při pokojové teplotě. Poté byly řezy 4x 5 minut omývány v PB. Následovala 1 hodina v inkubačním médiu (Tab. 2) se sekundární protilátkou (Tab. 3) ve tmě a 4x 5 minut omývání v PB ve tmě při pokojové teplotě. Vzorky byly opatrně osušeny filtračním papírem a zamontovány pod podložní sklíčka v mediu Aqua Poly/Mount (Polysciences, Warrington).

Při diaminobenzidínovém barvení (DAB) byly řezy 2x omyty v PB, 1 hodinu inkubovány v preinkubačním médiu (Tab. 1), 3x na 10 minut omyty v PB a 1 hodinu inkubovány v inkubačním médiu (Tab. 2) s primární protilátkou. Po omytí v PBS/0.25% Triton X-100 byly řezy sítnice inkubovány v biotinylované kozí proti-králičí IgG (1:300, Sigma) naředěné v inkubačním médiu (Tab. 2, 2 hod, pokojová teplota), omyty v PBS/0.25% Triton X-100 a 2 hodiny inkubovány v ABC kitu (Vector Laboratories, Burlingame, CA) při pokojové teplotě. Peroxidáza byla vizualizovaná pomocí DAB/H₂O₂ (0,015% / 0,005%) v PBS. Vzorky byly zamontovány pod podložní krycí sklíčka ve Vectashield mounting mediu (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

2.3. Jádra fotoreceptorů

Jádra fotoreceptorů byla na řezech obarvena pomocí DAPI (Vectastain) a jejich vlastnosti vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu se standardní soupravou filtrů pro fluorescenční vizualizaci.

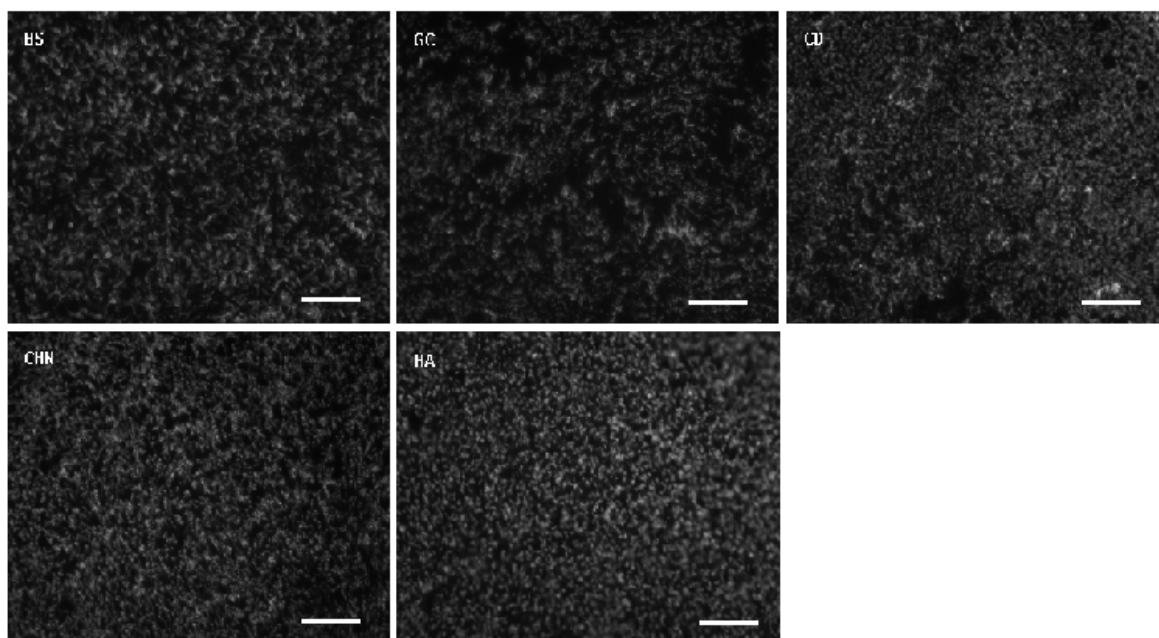
V. VÝSLEDKY

1. Obecné vlastnosti sítnice rypošovitých

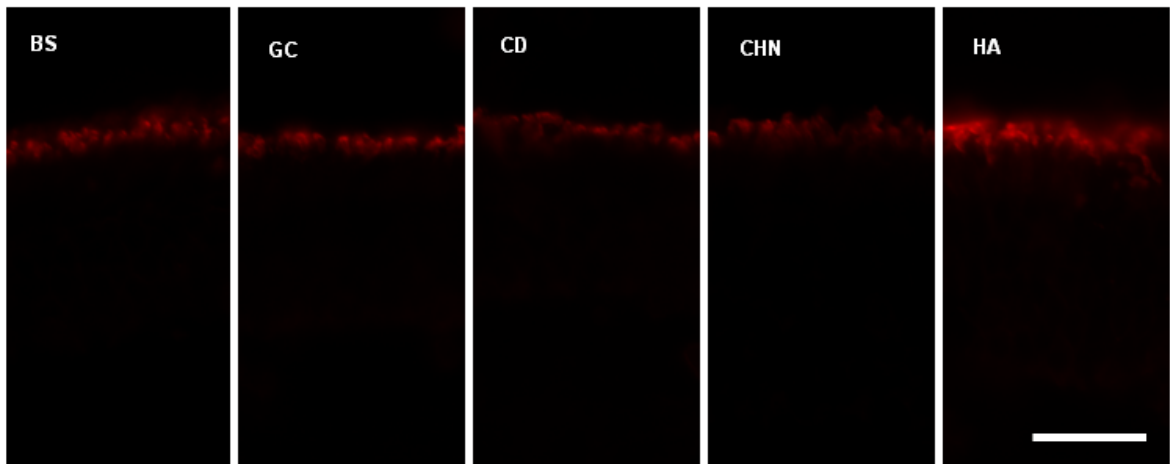
U všech druhů byl optický nerv lokalizován poblíž geometrického středu sítnice. Orientace sítnice byla určena buď podle označení na očním pohárku nebo byla určena pomocí svalů na něm. Fotoreceptory byly na sítnici rozmístěny homogenně kromě mírného centro-periferního gradientu; z vypreparovaných sítnic se nedala určit jejich orientace. Vertikální řezu sítnicemi ukázaly normální uspořádání všech vrstev u všech zkoumaných druhů beze známek výrazné regrese.

2. Tyčinky

Ze značení specifickou protilátkou rho4D2 vyplynulo, že u všech zkoumaných druhů převládají na sítnici tyčinky nad čípky. Intenzivně byly označeny vnější segmenty (Obr. 9, Obr. 10). Tyto výsledky souhlasí s výsledky studií u *F. mechowii*, *F. anelli* a *H. glaber* (Cernuda-Cernuda a kol. 2003; Peichl a kol. 2004) a lze jej rozšířit na ostatní druhy rypošovitých.

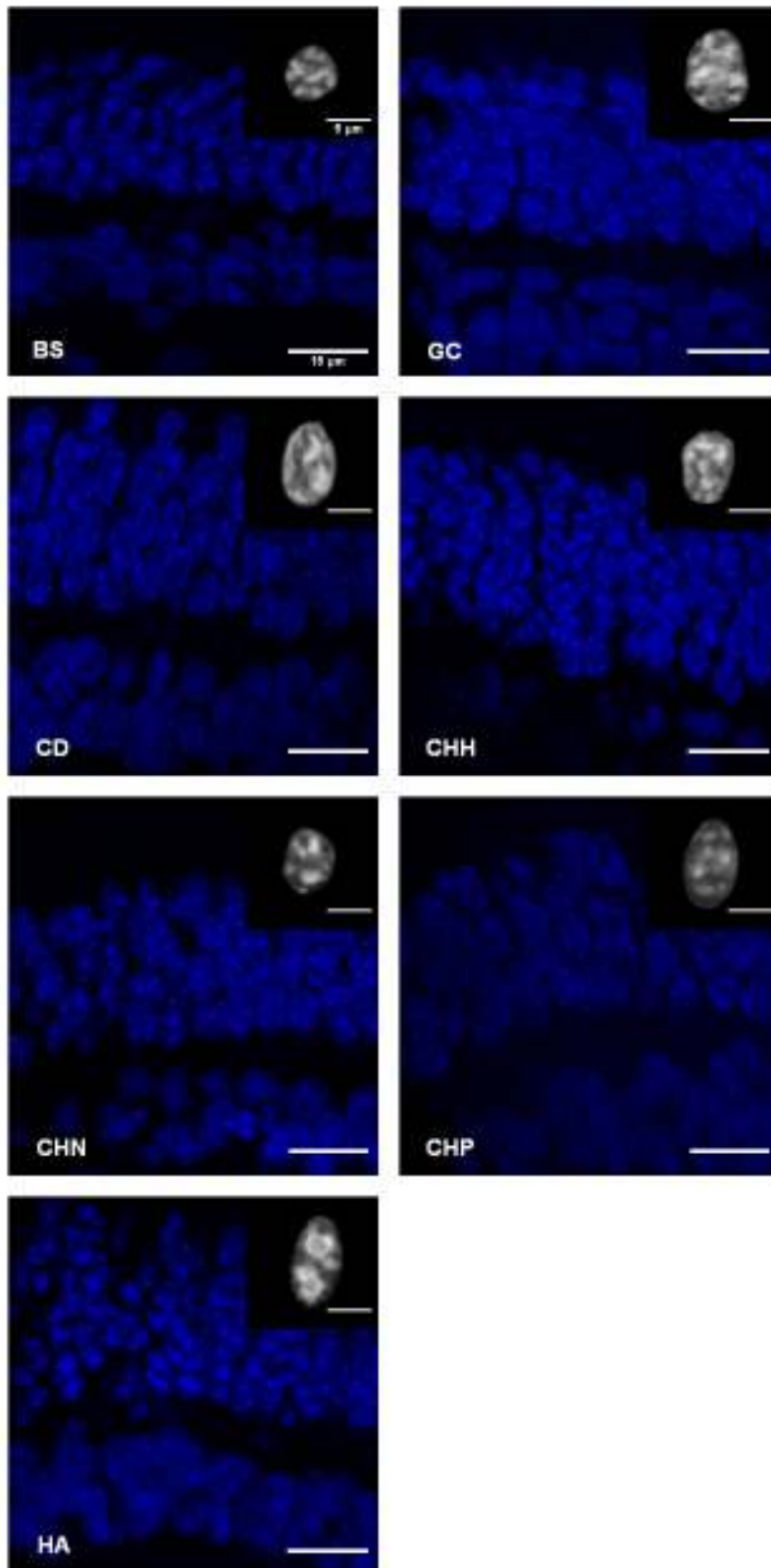


Obr. 9 Rodopsin na celých, na plocho namontovaných, sítnicích rypošovitých značený protilátkou rho4D2. BS- *Bathyergus suillus*, GC- *Georychus capensis*, CD- *Fukomys damarensis*, CHN- *Cryptomys natalensis* a HA- *Heliophobius argenteocinereus*. Měřítko 20 μ m.



Obr. 10 Rodopsin na 14 μm tlustých řezech sítnic rypošovitých značených protilátkou rho4D2. BS- *Bathyergus suillus*, GC- *Georychus capensis*, CD- *Fukomys damarensis*, CHN- *Cryptomys natalensis* a HA- *Heliophobius argenteocinereus*. Značeny jsou vnější segmenty tyčinek. Měřítko 15 μm .

Buněčná jádra tyčinek rypošovitých mají konvenční uspořádání s heterochromatinem tvořícím několik chromocenter, která přiléhají k okraji jádra nebo jadérku a euchromatin je lokalizován uvnitř jádra (Obr. 11).

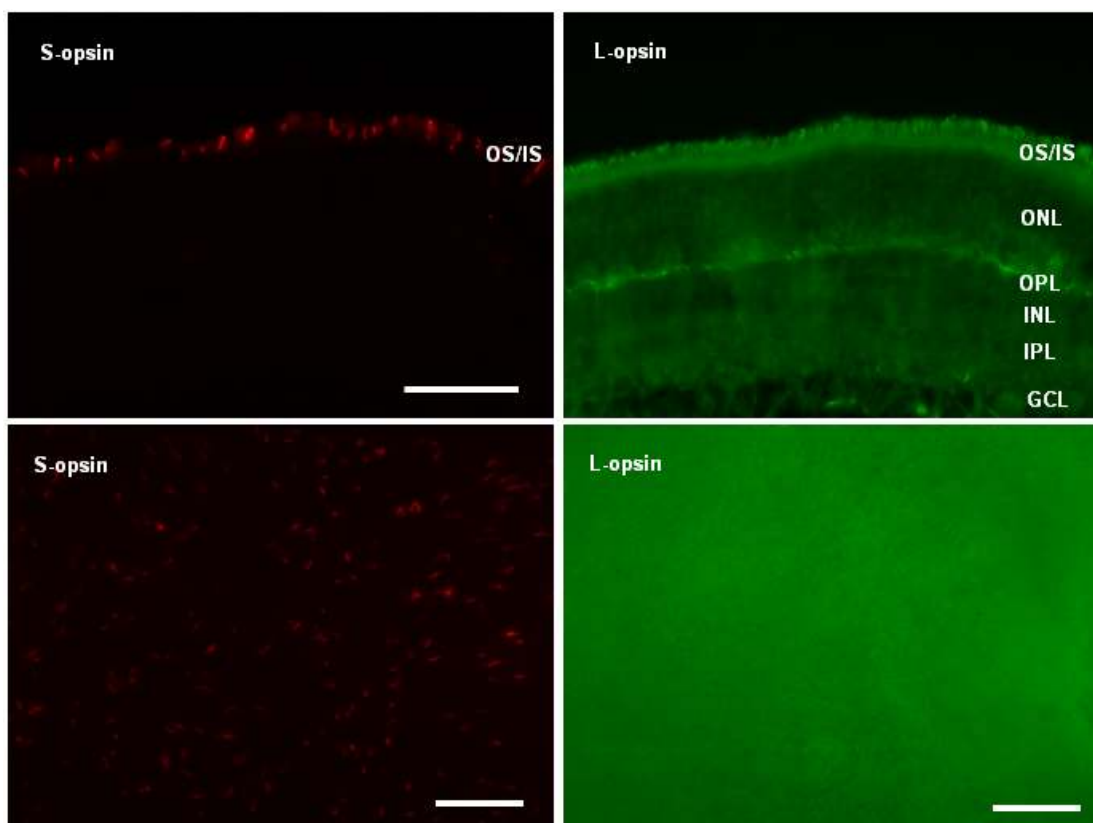


Obr. 11 Dapi barvení jader tyčinek. Heterochromatin je lokalizován na periferii jader. Tyčinky tedy mají konvenční uspořádání jádra. BS- *Bathyergus suillus*, GC- *Georychus capensis*, CD- *Fukomys damarensis*, CHH- *Cryptomys hottentotus*, CHN- *C. natalensis*, CHP- *C. pretoriae* a HA- *Heliophobius argenteocinereus*. Měřitko 15µm.

3. Čípky

Bathyergus suillus

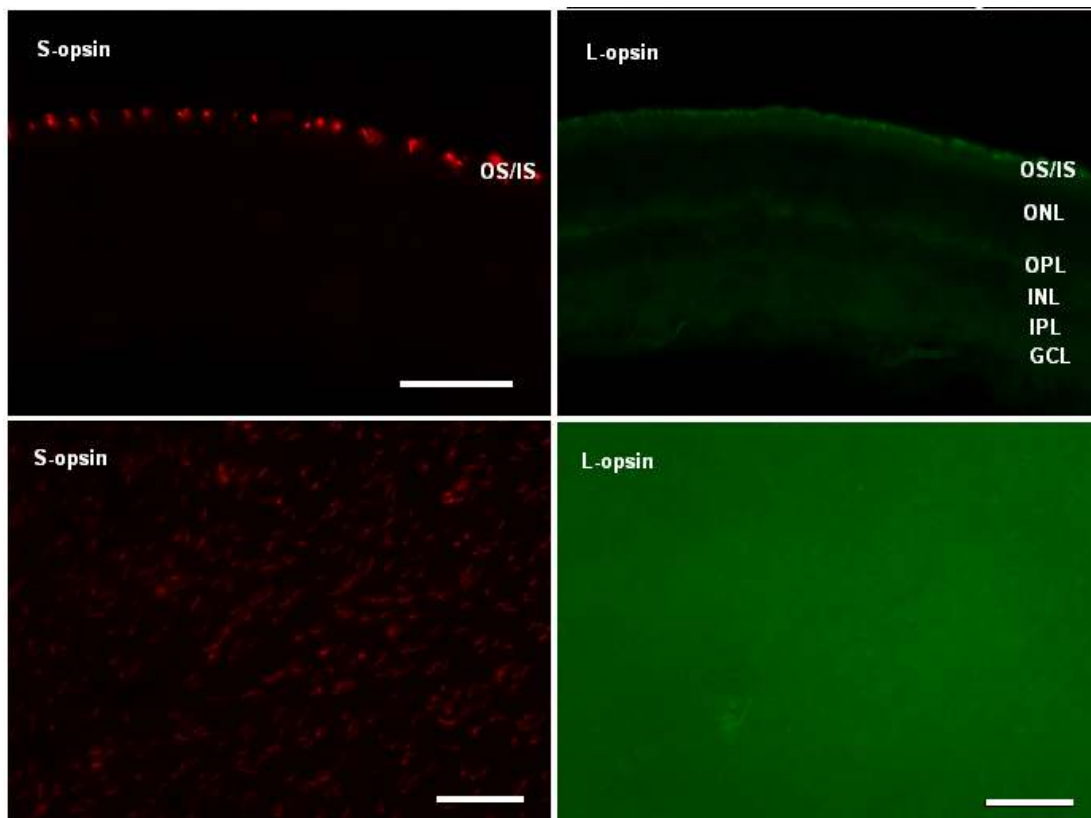
Specifické barvení celých sítnic i jejich řezů ukázalo, že protilátka značící S-opsin (Sc 14363) se vázala pouze na vnější segmenty S-čípků. Nebyly nabarveny žádné další struktury neuronů. Proti tomu protilátka pro L-opsin (JH 492) označila i další struktury L-čípků, ale celé značení bylo co do intenzity výrazně slabší než u barvení S-čípků. Obrázek 12 ukazuje sítnice s dvojitým barvením pro S-opsin a L-opsin (Sc 14363 červená, JH 492 zelená barva). Fotoreceptory druhu *Bathyergus suillus* nevykazují přesvědčivou imunoreaktivitu s JH 492. Zvýšená hladina fluorescence byla ve vnějších segmentech fotoreceptorů, ale fluorescenční struktury byly tak časté, že se zdá, že byly označeny všechny fotoreceptory. Přesvědčivé barvení S-čípků a pozorování Nomarského optikou ukázalo, že vnější segmenty fotoreceptorů byly přítomny a tudíž, že nepřítomnost L-čípků není artefaktem a nemůže být vysvětlena poničením sítnice. Některé čípky koexprimují S- a (v malém množství) i L-opsin. (Obr. 12)



Obr. 12 Identifikace čípků u rypoše druhu *Bathyergus suillus*. Nahoře: vertikální řezy sítnicí. Dole: celé, na plocho montované sítnice (retinal wholemounts). Vpravo: S-čípky značené protilátkou proti S-opsinu (Sc 14363). Vlevo: L-čípky značené protilátkou proti L-opsinu (JH 492). OS/IS- vnější (outer) a vnitřní (inner) segmenty fotoreceptorů, ONL- vnější nukleární vrstvy, OPL- vnější plexiformní vrstva, INL- vnitřní nukleární vrstva, IPL- vnitřní plexiformní vrstva, GCL- vrstva gangliových buněk. Signál L-opsinu byl velice slabý a je záměrně přexponován. Měřítko 20 μ m.

Georychus capensis

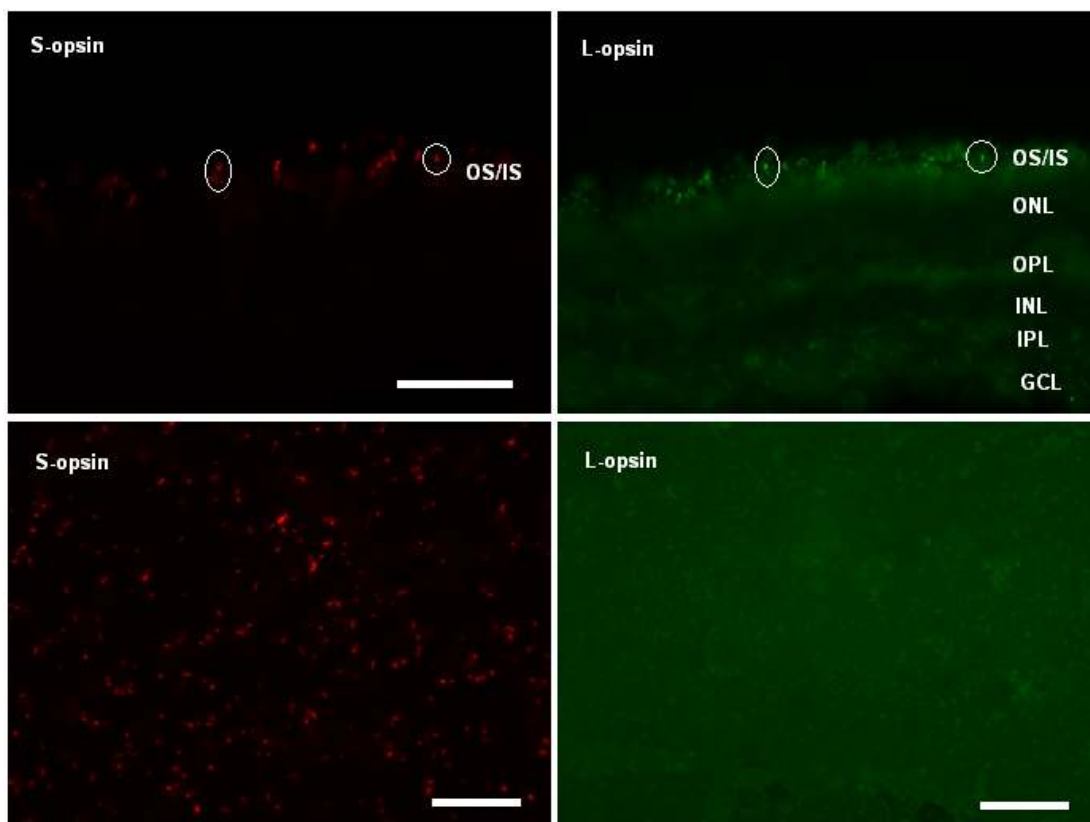
Imunochemické barvení čípků na řezech a celých sítnicích u tohoto druhu vykazovalo vzor velice podobný *B. suillus*. Protilátka Sc 14363 jasně označila S-čípky, ale JH 492 označila i další struktury L-čípků. Fotoreceptory druhu *Georychus capensis* také nevykazovaly přesvědčivou imunoreaktivitu s JH 492. Značení JH 492 bylo opět velice slabé a zdá se, že označovalo všechny fotoreceptory. S-čípky jsou dominantními čípkami sítnice. Sítnice nebyla poničená a nepřítomnost L-čípků nemůže být vysvětlena porušením vnějších segmentů fotoreceptorů. Některé čípky se zdají koexprimovat S- a (v malém množství) i L-opsin. (Obr. 13)



Obr. 13 Identifikace čípků u rypoše druhu *Georychus capensis*. Nahoře: vertikální řezy sítnicí. Dole: celé, na plocho montované sítnice (retinal wholemounts). Vpravo: S-čípky značené protilátkou proti S-opsinu (Sc 14363). Vlevo: L-čípky značené protilátkou proti L-opsinu (JH 492). OS/IS- vnější (outer) a vnitřní (inner) segmenty fotoreceptorů, ONL- vnější nukleární vrstvy, OPL- vnější plexiformní vrstva, INL- vnitřní nukleární vrstva, IPL- vnitřní plexiformní vrstva, GCL- vrstva gangliových buněk. Signál L-opsinu byl velice slabý a je záměrně přexponován. Měřítko 20 μ m.

Fukomys damarensis

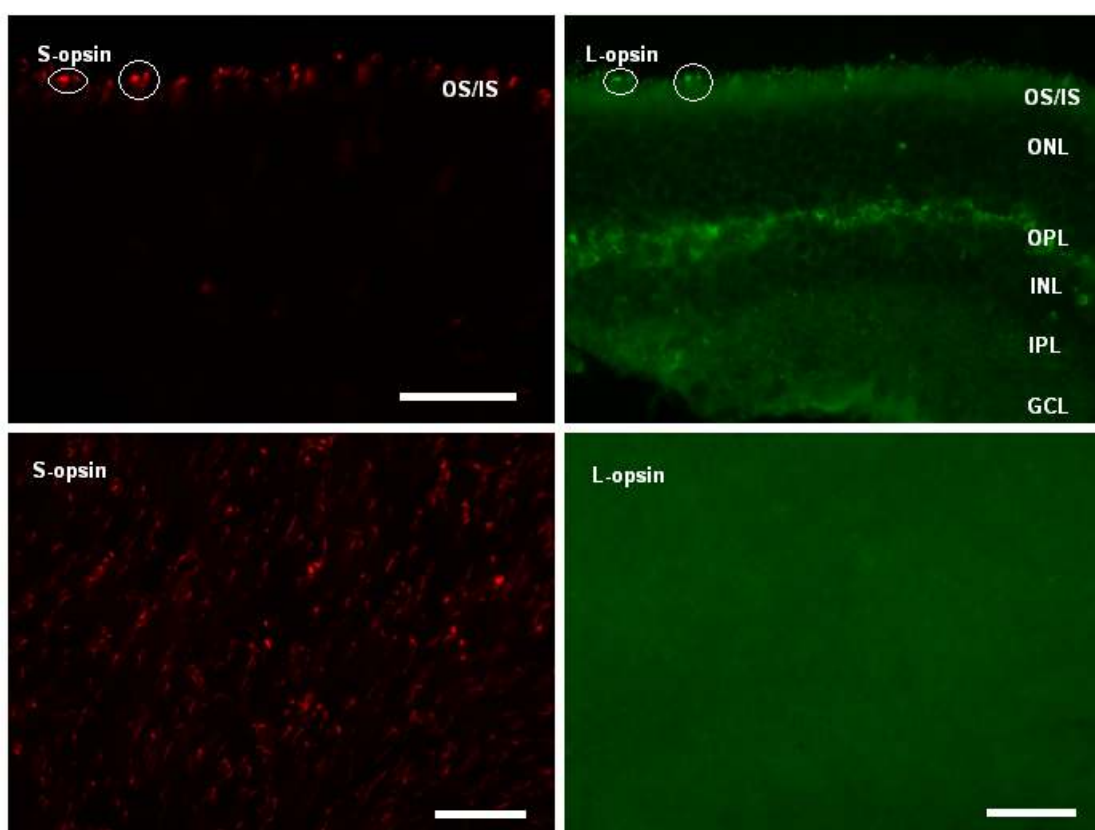
Sítnice *F. damarensis* vykazovala velice podobný vzor předešlým. Spektrální totožnost čípků byla hodnocena pomocí opsin-specifických protilátek. S-čípky pomocí protilátky Sc 14363 a L-čípky pomocí JH 492. Na dvojité značených řezech sítnic byly L-opsin exprimující čípky značeny i S-opsin vázající protilátkou. Značení L-opsinu bylo výrazně slabší a slabě barvilo i jiné struktury fotoreceptorů. Nicméně na jejich sítnicích byla prokázána přítomnost S- i L-opsinu. Ve všech identifikovaných L-čípcích byl přítomen i S-opsin a jeho značení bylo výraznější. Fotoreceptory, ve kterých byl přítomen L-opsin, lze tedy považovat za duální čípky, které exprimují dominantně S-opsin a v menším množství také L-opsin (Obr. 14).



Obr. 14. Identifikace čípků u rypoše druhu *Fukomys damarensis*. Nahoře: vertikální řezy sítnic. Dole: celé, na plocho montované sítnice (retinal wholemounts). Vpravo: S-čípky značené protilátkou proti S-opsinu (Sc 14363). Vlevo: L-čípky značené protilátkou proti L-opsinu (JH 492). Kroužkem jsou označeny čípky koexprimující S- a L-opsin. OS/IS- vnější (outer) a vnitřní (inner) segmenty fotoreceptorů, ONL- vnější nukleární vrstvy, OPL- vnější plexiformní vrstva, INL- vnitřní nukleární vrstva, IPL- vnitřní plexiformní vrstva, GCL- vrstva gangliových buněk. Signál L-opsinu byl velice slabý a je záměrně přeexponován. Měřítko 20 μ m.

Cryptomys natalensis

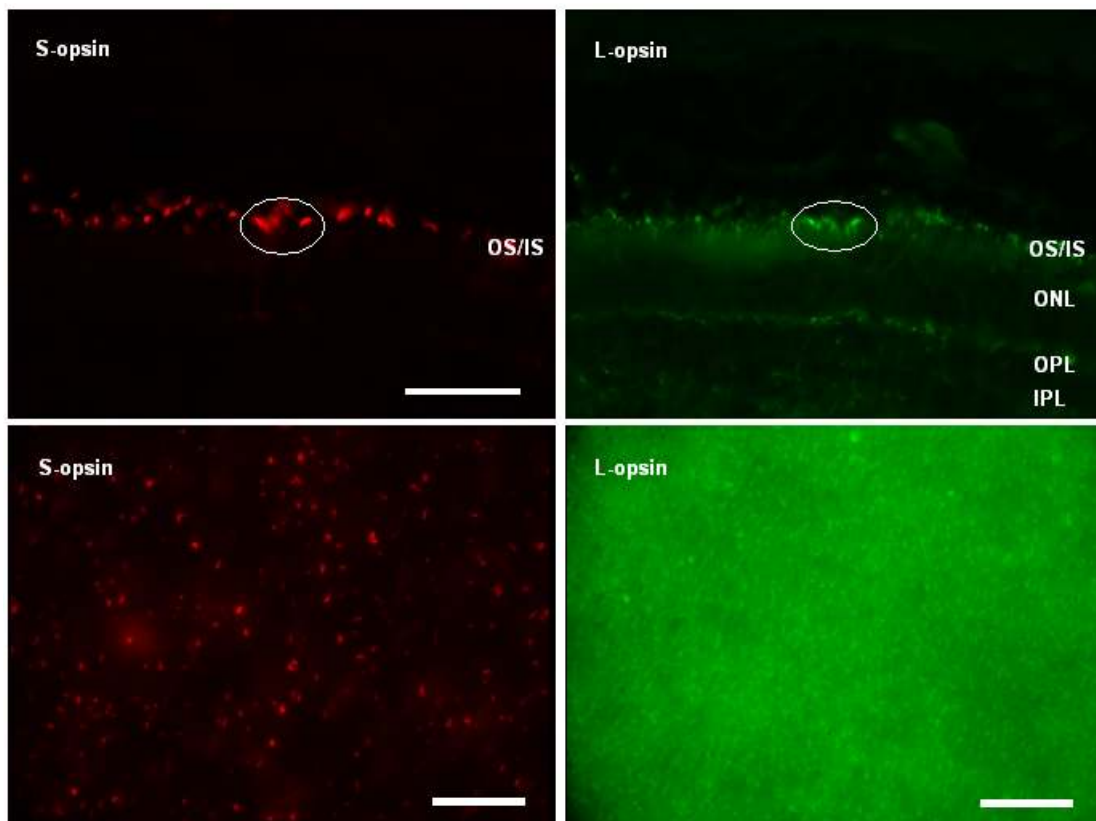
Specifické barvení celých sítnic i jejich řezů ukázalo, že protilátka značící S-opsin (Sc 14363) se vážala pouze na vnější segmenty S-čípků, ale protilátka pro L-opsin (JH 492) označila i další struktury L-čípků. Značení na L-opsin bylo co do intenzity výrazně slabší než u barvení S-opsinu. Fotoreceptory, ve kterých byl přítomen L-opsin, lze tedy považovat za duální čípky, které exprimují dominantně S-opsin a v menším množství také L-opsin (Obr. 15).



Obr. 15. Identifikace čípků u rypoše druhu *Cryptomys natalensis*. Nahoře: vertikální řezy sítnic. Dole: celé, na plocho montované sítnice (retinal wholemounts). Vpravo: S-čípky značené protilátkou proti S-opsinu (Sc 14363). Vlevo: L-čípky značené protilátkou proti L-opsinu (JH 492). Kroužkem jsou označeny čípky koexprimující S- a L-opsin. OS/IS- vnější (outer) a vnitřní (inner) segmenty fotoreceptorů, ONL- vnější nukleární vrstva, OPL- vnější plexiformní vrstva, INL- vnitřní nukleární vrstva, IPL- vnitřní plexiformní vrstva, GCL- vrstva gangliových buněk. Signál L-opsinu byl velice slabý a je záměrně přeexponován. Měřítka 20 μ m.

Heliophobius argenteocinereus

Sítnice *H. argenteocinereus* vykazovala velice podobný vzor předešlým. Spektrální totožnost čípků byla hodnocena pomocí opsin-specifických protilátek. S-čípky pomocí protilátky Sc 14363 a L-čípky pomocí JH 492. Na dvojité značených řezech sítnic byly L-opsin exprimující čípky značeny i S-opsin vázající protilátkou. Značení L-opsinu bylo výrazně slabší a slabě barvilo i jiné struktury fotoreceptorů. Nicméně na jejich sítnicích byla prokázána přítomnost S- i L-opsinu. Ve všech identifikovaných L-čípcích byl přítomen i S-opsin a jeho značení bylo výraznější. Fotoreceptory, ve kterých byl přítomen L-opsin, lze tedy považovat za duální čípky, které exprimují dominantně S-opsin a v menším množství také L-opsin. (Obr. 16)



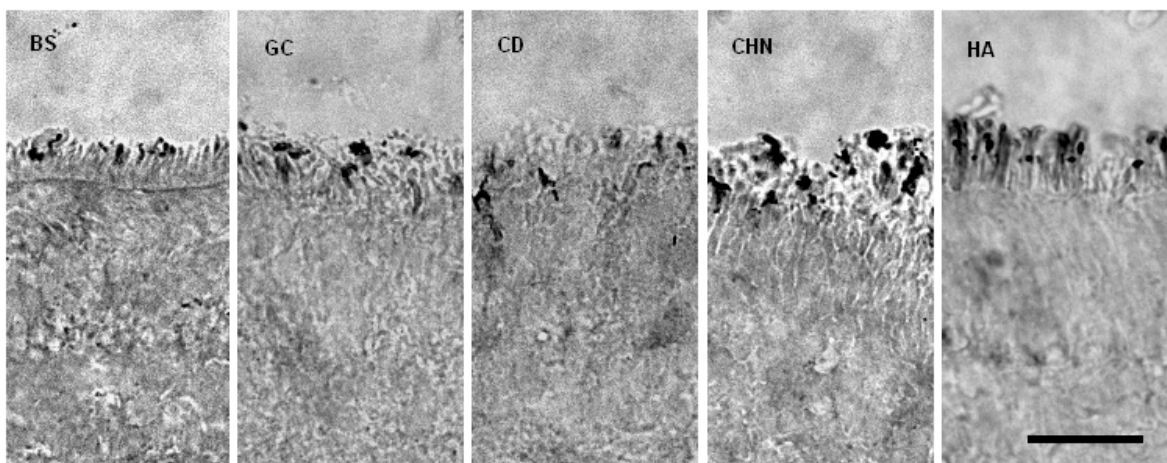
Obr. 16. Identifikace čípků u rypoše druhu *Heliophobius argenteocinereus*. Nahoře: vertikální řezy sítnic. Dole: sítnice vyrovnané na plocho. Vpravo: S-čípky značené protilátkou proti S-opsinu (Sc 14363). Vlevo: L-čípky značené protilátkou proti L-opsinu (JH 492). Kroužkem jsou označeny čípky koexprimující S- a L-opsin. OS/IS- vnější (outer) a vnitřní (inner) segmenty fotoreceptorů, ONL- vnější nukleární vrstvy, OPL- vnější plexiformní vrstva, INL- vnitřní nukleární vrstva, IPL- vnitřní plexiformní vrstva, GCL- vrstva gangliových buněk. Signál L-opsinu byl velice slabý a je záměrně přexponován, aby bylo vůbec něco patrné. Měřítko 20 μ m.

U žádného ze zkoumaných druhů dvojité barvení pro rodopsin a S-opsin neodhalilo žádnou kolokalizaci obou značení v některém z fotoreceptorů. Je tedy zřejmé, že fotoreceptory rypošovitých vykazují jednoznačnou segregaci do tyčinek a čípků, která je typická pro savce.

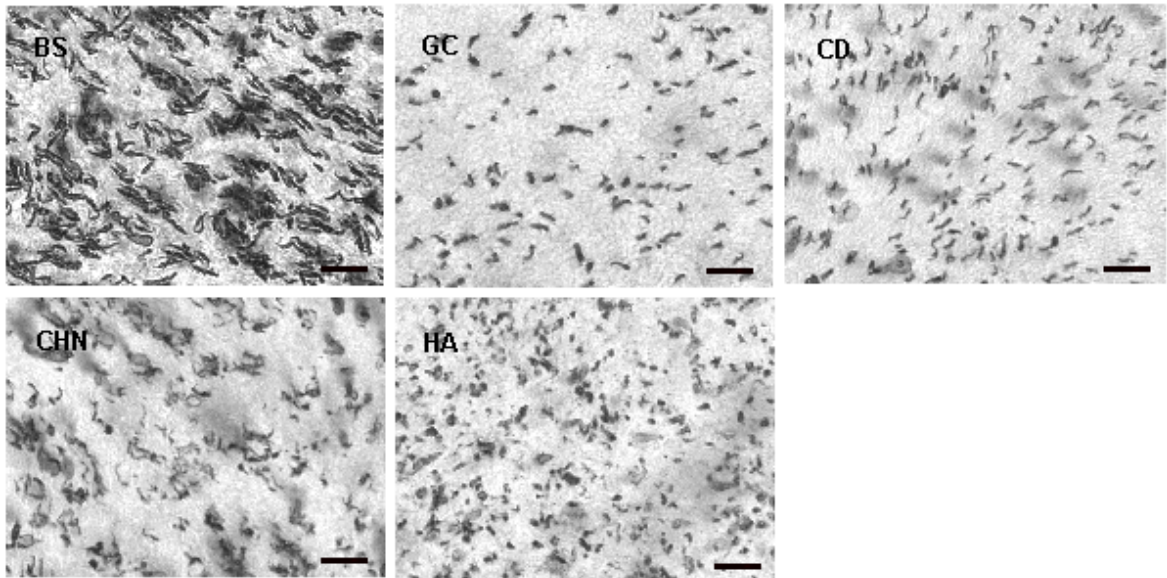
4. Hustoty čípků

Hustoty čípků na sítnicích druhů *Bathyergus suillus*, *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *Cryptomys natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus* byly hodnoceny na celých na plocho namontovaných sítnicích. Vzhledem k dominanci S čípků a k vysoké míře komprese L- a S-opsinu se odhad hustot čípků na základě hustoty S-čípků zdá jako přijatelná aproximace. Ke kvantifikacím hustot byly použity celé, na plocho montované sítnice barvené protilátkou Sc 14363 a vizualizované pomocí PAP-DAB protokolu (Obr. 17 B).

A)



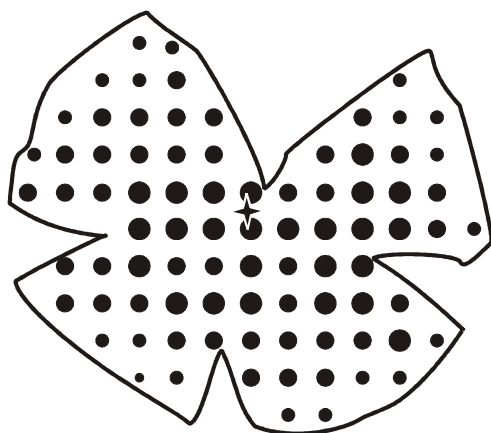
B)



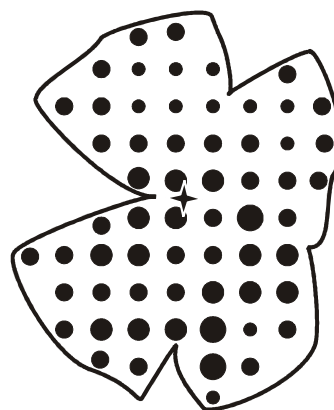
Obr. 17 S-opsin na řezech a celých sítnicích rypšovitých (Sc 14363, PAP-DAB vizualizace). Z řezů (A) je patrné, že jsou značeny pouze vnější segmenty S-čípků. Systematicky nafocené obrázky z celých sítnic (B) byly použity k počítání absolutních hustot S-čípků. BS- *Bathyergus suillus*, GC- *Georychus capensis*, CD- *Fukomys damarensis*, CHN- *Cryptomys natalensis* a HA- *Heliophobius argenteocinereus*. Měřítka 15 μ m.

Hustoty S-čípků se u druhu *Bathyergus suillus* pohybovaly od 8000/mm² do 25000/mm², *Georychus capensis* od 4500/mm² do 15000/mm², *Fukomys damarensis* od 4500/mm² do 20000/mm², *Cryptomys natalensis* od 10000/mm² do 30000/mm² a *Heliophobius argenteocinereus* od 15000/mm² do 35000/mm². U všech těchto sítnic nalezneme gradient hustoty S-čípků od centra sítnice k její periferii. Sítnice druhů *C. natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus* jsou obecně velice malé a fotoreceptory jsou menší a jsou hustě uspořádány, proto jsou na nich hustoty všech fotoreceptorů, tedy i S-čípků vyšší. Celkově jsou u všech zkoumaných druhů hustoty S-čípků neobvykle vysoké. Pro jednotlivé sítnice nalezneme rozložení gradientu hustot S-čípků na obrázku 18.

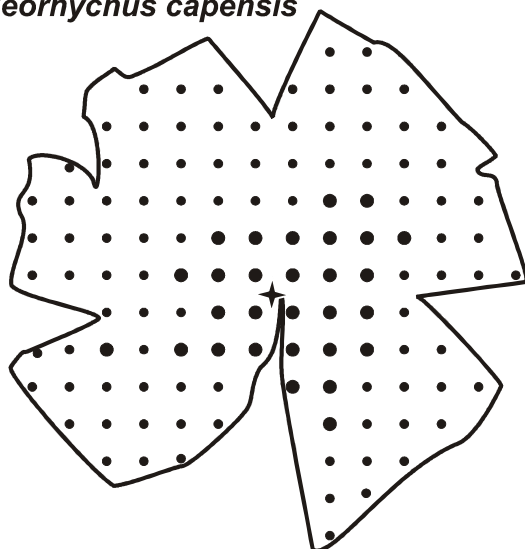
Bathyergus suillus



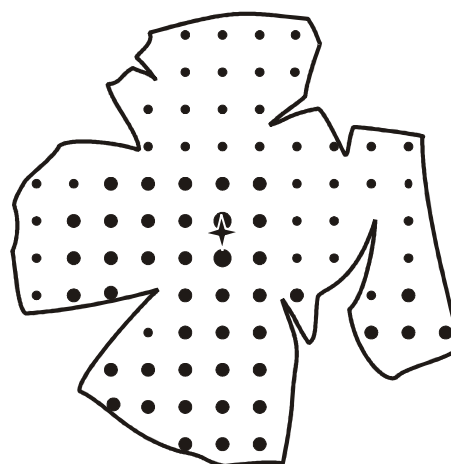
C. natalensis



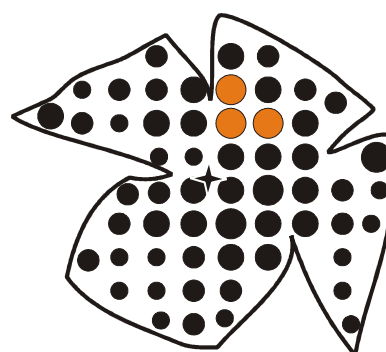
Georchychus capensis



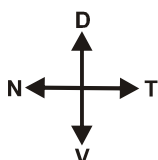
C. damarensis



Heliophobius arg.



- 4500 - 10000
- 10000 - 15000
- 15000 - 20000
- 20000 - 25000
- 25000 - 30000
- 30000 - 35000



Obr. 18 Mapy distribuce hustot S-čipků u rypošovitých z celých sítinc značených pomocí Sc 14363, PAP-DAB vizualizace. Hodnoty jsou udávány na mm^2 , pohybují se mezi 4500 a $35000/\text{mm}^2$, jsou tedy neobvykle vysoké. Oranžově jsou na obrázku značené oblasti s příliš vysokými hustotami čipků, kde se kvůli překryvům nedaly fotoreceptory od sebe jednoznačně odlišit, hodnoty tedy nemusí být přesné.

VI. DISKUZE

Sítnice podzemních savců jsou vhodným objektem pro komparativní studie, protože odhalují adaptace na život v trvalé temnotě, tedy téměř úplnou absenci světelných podnětů. Rypoši čeledi Bathyergidae žijí v podzemních chodbách již velice dlouho, od časného miocénu pokud ne déle (Bennet a Faulkes 2000). Obecně se předpokládá, že zrakový systém podzemních hlodavců, včetně oka a sítnice, vykazuje závažné strukturní a funkční regrese. V tomto kontextu se zdají vlastnosti sítnic rypošovitých překvapivé. Zprvė čípky tvoří velkou poměrnou část fotoreceptorů (Cernuda-Cernuda a kol. 2003, Peichl a kol. 2004). Zadruhé u zatím prostudovaných druhů rypošů čeledi Bathyergidae (*Fukomys anselli*, *F. mechowii* a *Heterocephalus glaber*) většina čípků exprimuje S-opsin (~ 90%, citlivý na krátké vlnové délky), část z nich slabě koexprimuje i L-opsin (~70%, citlivý na středně dlouhé- dlouhé vlnové délky); čípků, které by měly pouze L-opsin, bylo detekováno pouze ~10% Peichl a kol. 2004). Na sítnicích většiny ostatních savců dominují L-čípky a S-čípky u nich tvoří pouze menšinu. Zdá se, že unikátní převaha S-čípků na sítnicích tří dosud prostudovaných druhů rypošů čeledi Bathyergidae by mohla být adaptací na podzemní způsob života v téměř úplné tmě. Skupina proto byla v této práci rozšířena o další druhy rypošů cíleně vybrané tak, aby se lišily v množství nadzemních aktivit, které korelují například s množstvím nervových vláken v optickém nervu. *Bathyergus suillus* a *Georychus capensis* jsou výrazně více zrakově orientováni než *Fukomys damarensis*, *Cryptomys natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus* (Bennet a Faulkes 2000, Němec a kol. 2007).

Než se dále dostaneme k funkčnímu významu těchto nálezů, bylo by vhodné oddiskutovat význam imunocytochemických dat. Identifikace čípků pomocí opsin-specifických protilátek je široce používaný přístup. S- a L-opsin vykazují u různých druhů savců vysokou míru homologie, ale rozdíly mezi aminokyselinovým složením existují. Proto jsou k dispozici různé protilátky, které více či méně spolehlivě detekují opsiny napříč druhy. U protilátek Sc 14363, JH 455 (S-opsin, dávají stejný výsledek) a JH 492 (L-opsin) bylo prokázáno, že spolehlivě odliší S- a L-opsin, respektive u celé řady savců včetně několika druhů hlodavců (shrnutí v Peichl a Moutairou, 1998; Ahnelt a Kolb 2000; Glösmann a Ahnelt 2002; Peichl a kol. 2004, Glösmann a kol. 2008). Intenzivní značení

čípků pomocí Sc 14363 a JH 455 dávajících stejné výsledky je silným důkazem, že čípky rypošovitých exprimují S-opsin (Peichl a kol. 2004).

Výklad L-opsinového barvení se zdá méně jasný. Bylo pozorováno slabé značení pomocí JH 492 (a ještě ne u všech druhů), které by mohlo naznačovat nízkou úroveň exprese L-opsinu nebo nízkou afinitu protilátky vzhledem k druhově-specifickým rozdílům v opsinech. Po konzultacích s L. Peichlem o zkušenostech se spolehlivým a intenzivním značením pomocí JH 492 u různých hlodavců, se zdá možnost, že by protilátka rozpoznávala více epitopů, méně pravděpodobná. Proto se dá předpokládat, že u rypošovitých je L-opsin exprimován jen na velice nízké úrovni, popřípadě u některých druhů vůbec. Nicméně s konečnou platností bude pro řešení této otázky nezbytné klonovat a sekvenovat gen pro L-opsin a následně studovat jeho expresi na sítnici pomocí Real-time PCR. U slepce druhu *Spalax ehrenbergi* byla přítomnost funkčního genu pro L-opsin prokázána molekulárně (David-Gray a kol. 1998, 1999).

1. Sítnice rypošovitých

Nejlépe prostudovaným druhem podzemního hlodavce je slepec druhu *Spalax ehrenbergi*, který má zakrnělé podkožní oči (Sanyal a kol. 1990; Herbin a kol. 1995; Cernuda-Cernuda a kol. 2002). Jeho sítnice se zdá poměrně normální, ale méně organizovaná než u jiných zkoumaných savců (Cernuda-Cernuda a kol. 2002). Celkově se předpokládá, že extrémně redukované oko slepce má funkci spíše v percepci fotoperiody než při zpracování obrazu (Cooper a kol. 1993 a, b; Cernuda-Cernuda a kol. 2002). Podle pozorování sítnic druhů *Bathyergus suillus*, *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *Cryptomys hottentotus*, *C. natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus* (tato práce) a zkoumání očí a sítnic druhů *Fukomys anelli*, *F. mechowii* a *Heterocephalus glaber* (Peichl a kol. 2004) se zdá, že *Spalax ehrenbergi* představuje extrémní spíše než typický příklad adaptace k podzemnímu způsobu života. Studované druhy rypošů vykazují podobně výrazné anatomické a fyziologické adaptace k podzemnímu životu jako slepec. Na rozdíl od slepce však mají všechny studované druhy funkční oční víčka, do očí se dostane přímé světlo a sítnice je dobře organizovaná. Jejich oči jsou velmi podobné očím ostatních drobných savců a jsou vhodné ke zpracování obrazu. Normální morfologii oka mají také druhy *Fukomys anelli*, *F. mechowii* a *Heterocephalus glaber* (Cernuda-Cernuda a kol. 2003, Peichl a kol. 2004; Němec a kol. 2007, 2008).

2. Hustoty fotoreceptorů u rypošovitých

Rypoši mají hustoty fotoreceptorů mezi 80000 a 150000/mm² (Peichl a kol. 2004).

U rypošů druhů *Fukomys ansellii*, *F. mechowii* a *Heterocephalus glaber* pozorování ukázalo hustoty čípků 8000-15000/mm², což by odpovídalo přibližně 10% fotoreceptorů (Cernuda-Cernuda a kol. 2003, Peichl a kol. 2004). Hustoty čípků na sítnicích druhů *Bathyergus suillus*, *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *Cryptomys natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus*, tudíž i jejich poměrné zastoupení mezi fotoreceptory, jsou dokonce ještě vyšší. Vzhledem k velice nízké expresi L-opsinu a vysoké expresi S-opsinu u v této práci zkoumaných druhů, byly k odhadu hustot čípků použity S-čípky. Všechny identifikované L-čípky také exprimovaly v ještě větší míře S-opsin, tudíž se odhad hustot čípků na základě hustoty S-čípků zdá jako přijatelná aproximace. Hustoty S-čípků se u druhu *Bathyergus suillus* pohybovaly od 8000/mm² do 25000/mm², *Georychus capensis* od 4500/mm² do 15000/mm², *Fukomys damarensis* od 4500/mm² do 20000/mm², *C. natalensis* od 10000/mm² do 30000/mm² a u *Heliophobius argenteocinereus* od 15000/mm² do 35000/mm². To je u striktně podzemních druhů opravdu nečekané. U nočních savců se pohybují poměry čípků k tyčinkám v rozmezí 0,5-3% (Peichl a kol. 2005).

3. Tyčinky rypošovitých

Absolutní hustoty tyčinek jsou u v podzemí žijících druhů prokazatelně nižší než u na povrchu žijících živočichů. U *Talpa europea* byly napočítány hustoty kolem 100 000/mm² (Glösmann a kol. 2008), u rypošů (Bathyergidae) 80 000-50 000/mm² (Cernuda-Cernuda a kol. 2003; Peichl a kol. 2004) a u *Geomys* (Geomyidae) 55000-100000/mm² (Williams a kol. 2005). Naproti tomu u hlodavců žijících na povrchu nalezneme hustoty tyčinek podstatně vyšší, například u myši nalezneme 437 000 tyčinek na mm² (Jeon a kol. 1998).

Komparativní studie ale neprokázaly konvergentní redukci množství tyčinek u podzemních druhů. Příkladem je studie tří druhů hlodavců podřádu Hystricognathi, denní *Octodon degus* 100 000 tyčinek/mm² (Jacobs a kol. 2003), soumravný *Cavia porcellus* 120 000-200 000 mm⁻² (Peichl a kol. 1994) a v podzemních chodbách žijící *Spalacopus cyanus* 200 000 mm⁻² (Peichl a kol. 2005).

Tyčinky u podzemních druhů mají široké vnější segmenty, které se výrazně liší délkou. Tyčinky jsou krátké u rypošů čeledi Bathyergidae, dlouhé u *Geomys sp.* a *S. cyanus* (Němec a kol. 2007).

Rozsáhlá srovnávací analýza ukázala, že architektura jader tyčinek koreluje se způsobem života (Solvei a kol. 2009). U nočních savců nalezneme invertovanou strukturu jader tyčinek, kde heterochromatin tvoří jedno velké chromocentrum ve středu jádra.

U denních jsou jádra organizována běžným způsobem. Dalo by se předpokládat, že v podzemí žijící rypoši budou na nedostatek světla adaptováni obdobným způsobem jako noční živočichové, ale buněčná jádra tyčinek rypošovitých mají konvenční uspořádání s heterochromatinem tvořícím několik chromocenter, která přiléhají k okraji jádra nebo jadérku, euchromatin je lokalizován uvnitř jádra.

Nalezené vlastnosti tyčinek u rypošů čeledi Bathyergidae odpovídají hypotézám, že rypoši používají tyčinky, ne k vidění pod zemí, ale k detekci pronikání světla do podzemních systémů jako součást antipredačního chování (Němec a kol. 2007, Kott a kol. 2010).

4. Čípky rypošovitých

Dva typy opsinů (dichromacie) jsou ancestrálním znakem placentárních savců (Hunt a kol. 2007; Yokoyama 2000). Na rozdíl od slepce (*Spalax ehrenbergi*), kterému chybí S-opsin (David-Gray a kol. 2002), u rypošů čeledi Bathyergidae (Peichl a kol. 2004, tato práce) a u *Talpa europea* (Glösmann a kol. 1999) S-čípky na sítnici převládají. Slepce má S-opsinový gen, ale ten se stal nefunkčním díky hromadění škodlivých mutací. Předkové slepce kdysi měli funkční S-opsin a jeho ztráta vznikla jako adaptace na podzemní ekotop (David-Gray a kol. 2002). Zdá se, že *S. cyanus* exprimuje S- a L-opsin ve dvou oddělených populacích čípků (Peichl a kol. 2005). U *Thomomys bottae* nalezneme koexpresi S- a L-opsinu v dorzoventrálním gradientu stejně jako u myši (Williams a kol. 2005). U některých druhů savců (dokonce i některých hlodavců) S-čípky úplně chybí (Jacobs a kol. 1993, Peichl a Moutairou 1998).

Podíl čípků na sítnici vyšší než 10% řadí rypoše spíše mezi denní a soumravné druhy než mezi druhy noční. Převážně noční hlodavci mají malý relativní podíl čípků (např. myši 3%: Carter-Dawson a LaVail 1979; Jeon a kol. 1998; krysa 1%: Szél a Röhlich 1992; *Cricetomys* 0,5%: Peichl a Moutairou 1998). Vyšší podíl čípků, ale také velké rozdíly

nalezneme u převážně denních druhů (např. morče: 8-17%, Peichl a González-Soriano 1994; Osmák degu: 30%, Jacobs a kol. 2003; sysel: 70 - 95%, Kryger a kol. 1998).

Z tohoto pohledu je vysoký podíl čípků u v podzemí žijících rypošů, živočichu kteří jsou sotva kdy vystaveni dennímu světlu, zvláštní. Zajímavé je že podzemní *Talpa europea* má také přibližně 10% čípků (Glösmann a kol. 1999), a Geomyidae mohou mít až 25% čípků (Feldman a Phillips, 1984). Vlastní absolutní hustoty čípků v sítnicích rypošů nemusí být až tak odlišné jako třeba u myši (průměrná hustota čípků 12 400/mm²), ale myš má mnohem vyšší hustotu tyčinek 437000/mm² (Jeon a kol. 1998).

Dlouho se předpokládalo, že fotoreceptory savců exprimují jen jeden typ opsinu, ale zjistilo se, že fotoreceptory některých druhů mohou koexprimovat S- a L- opsin. Komprese opsinů byla demonstrována u vačnatců, sudokopytníků, primátů (včetně člověka), hlodavců (review Lukáts a kol. 2002, Szél a kol. 2000, Williams a kol. 2003) a u *Talpa europea* (Glösmann a kol. 1999). U myši jsou čípky s oběma typy opsinů funkční (Nikonov a kol. 2006, Jacobs a kol. 2004). Pokud jsou koexprimovány L- a S-opsin v jednom čípku, tento se stává širokospektrým fotoreceptorem.; Biologická funkce koexprese není zatím zcela jasná (Lyubarsky a kol. 2000). Relativní zastoupení S- a L-opsinu v duálních čípcích na sítnici myši se liší podle oblasti sítnice, ve ventrální části dominuje S-opsin a v dorzální L-opsin (Applebury a kol. 2000). Electroretinogram flicker photometry ukázala, že ventrální oblast sítnice je citlivější na krátké vlnové délky (Calderone a Jacobs 1995). Což dokazuje, že mix opsinů determinuje citlivost čípků na vlnové délky světla. V tomto kontextu se zdá pravděpodobným, že většina čípků rypošů exprimujících dominantně S-opsin a v podstatně menší míře též L-opsin, je maximálně citlivá v oblasti krátkých vlnových délek. U všech zkoumaných druhů rypošů velká většina z čípků exprimuje převážně S-opsin. Jen relativně málo čípků exprimuje pouze L-opsin. U *Talpa europea* přibližně 30% čípků koexprimuje S- a L-opsin (Glösmann a kol. 2008). U *F. anselli* asi 90% z čípků exprimovalo S-opsin, z toho pouze 20% byly konvenční S-čípky a ~70% duální čípky, které koexprimovaly L-opsin na nižší úrovni. Pouze 10% z nich bylo konvenčními L-čípky (Peichl a kol. 2004). U druhů *Bathyergus suillus* a *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *Cryptomys natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus* byla detekována jen velice slabá koexprese L-opsinu v některých S-čípcích (detekovaná exprese S-opsinu v nich byla daleko vyšší).

Absorpční maximum rodopsinu se nachází v oblasti 496-498nm (Zhao a kol. 2009), avšak přesná spektrální citlivost čípků u rypošů čeledi Bathyergidae není známá. Ve své práci jsem se snažila osekvenovat jejich S-čípky, bohužel bez úspěchu. V behaviorálních

studiih bylo prokázáno, že rypoši *Fukomys mechowii* a *Heliophobius argenteocinereus* se vyhýbají bílému, modrému a zeleno-žlutému světlu, avšak jejich reakce na UV a červené světlo byly náhodné (Kott a kol. 2010). Pokud mají rypoši funkční L-čípky (v naší práci nebyly L-čípky nalezeny, pouze u některých S-čípků byla zjištěna poměrně nízká koexprese L-opsinu), mají absorpční maximum v oblasti zelené-žluté 495-535nm (Kott a kol. 2010, Jacobs a kol. 1993, Jacobs a kol. 2009). Behaviorální studie *Fukomys mechowii* a *Heliophobius argenteocinereus* také napovídá, že absorpční maximum S-opsinu u rypošů bude v modré až fialové oblasti světelného spektra (Kott a kol. 2010). V závislosti na druhu má S-opsin u hlodavců obvykle absorpční maximum v blízké UV až fialové oblasti (Peichl a kol. 2005, Hunt a kol. 2007) avšak *Fukomys mechowii* a *Heliophobius argenteocinereus* na UVA světlo vůbec nereagovali, což je zvláštní a napovídá to, že absorpční maximum jejich S-čípků se vyskytuje v modré-fialové oblasti (Kott a kol. 2010).

Podle pozorování sítnic druhů *Bathyergus suillus*, *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *C. hottentotus*, *C. natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus* (tato práce) a zkoumání očí a sítnic druhů *Fukomys anelli*, *F. mechowii* a *Heterocephalus glaber* (Peichl a kol. 2004) se zdá, že unikátní distribuce fotoreceptorů na sítnici rypošů čeledi Bathyergidae (převaha S-čípků a nízká koexprese L-opsinu v některých z nich) je ancestrálním znakem nebo je kauzálně spjata s něčím jiným než adaptací na podzemní způsob života, protože nevykazuje korelaci s množstvím nadzemních aktivit. *Bathyergus suillus* a *Georychus capensis* mají větší množství nervových vláken v optickém nervu a více nadzemních aktivit více než ostatní zkoumané druhy (Němec a kol. 2007, 2008), vykazují však stejné uspořádání fotoreceptorů jako ostatní druhy.

Nová studie na Pax8^{-/-} hypothyroidních myších ukázala, že S-opsin byl u těchto myší ve všech čípcích upregulován (bylo ho exprimováno více než u normální myši) a L-opsin downregulován (bylo ho exprimováno méně než u normální myši), zmizel také dorzoventrální gradient exprese S- a L-opsinu (Glashke a kol. 2010). Ovlivnění exprese opsinů tyroidními hormony bylo také prokázáno u *Oncorhynchus kisutch* (Cheng a kol. 2009) a *O. mykiss* (Veldhoen a kol. 2006). *Oncorhynchus kisutch* byl během raných fází vývoje injikován tyroidní hormon T₄, který způsobil reverzibilní posun absorpčního maxima S-čípků z UV oblasti do modré (Cheng a kol. 2009). U rypoše *Heterocephalus glaber* byla prokázána nízká hladina tyroidních hormonů (například již zmíněného T₄) v souvislosti s podmínkami spojenými s jejich podzemním způsobem života (Buffstein a kol. 2000, Buffstein 2005, Buffenstein R, Pinto M 2008). Nízká hladina tyroidních hormonů u rypošů čeledi Bathyergidae by tedy mohla vysvětlovat unikátní převahu

S-čípků (Peichl a kol. 2004, tato práce) a dokonce i behaviorálně prokázaný spektrální posun jejich absorpčního maxima z UV, UV-blízké fialové oblasti obvyklé pro hlodavce (Peichl a kol. 2005, Hunt a kol. 2007) do oblasti fialové až modré (Kott a kol. 2010, Cheng a kol. 2009).

VII. SOUHRN

Afričtí rypoši (Bathyergidae) žijí v podzemí již po velice dlouhou dobu. Nejstarší fosilní nálezy jejich chodeb pochází již z časného miocénu (Bennet a Faulkes 2000). Dají se u nich tudíž očekávat různé adaptace k životu v trvalé tmě, především silaná redukce oka a regrese zrakového systému. Oproti očekávání je však u všech dosud studovaných druhů rypošů (*Cryptomys anselli*, *C. mechowii*, *Heterocephalus glaber*, *Bathyergus suillus*, *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *Cryptomys natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus*) oko dobře vybaveno k obrazovému vidění: oční víčka a optický aparát jsou normálně vyvinuty, sítnice hladce vystílá oční pohárek a je normálně organizována (Cernuda-Cernuda a kol. 2003, Peichl a kol. 2004; Němec a kol. 2007, 2008).

Převažujícím fotoreceptorem jsou tyčinky, nicméně podíl čípků ($\geq 10\%$) je mnohem vyšší než by bylo lze očekávat u podzemního zvířete adaptovaného na život v trvalé temnotě. Jádra tyčinek mají konvenční stavbu s většinou heterochromatinu lokalizovanou na periferii jádra a euchromatinem v jeho středu, tedy organizaci typickou pro savce s denní aktivitou. Unikátní je vzor exprese čípkových opsinů s převahou S-čípků na celé sítnici. U druhu *Fukomys anselli* asi 90% z čípků exprimovalo S-opsin, z toho pouze 20% byly konvenční S-čípky a ~70% duální čípky, které koexprimovaly L-opsin na nižší úrovni. Pouze 10% z čípků bylo konvenčními L-čipky (Peichl a kol. 2004). Velmi podobný vzor exprese byl nalezen rovněž u druhů *Fukomys mechowii* a *Heterocephalus glaber* (Peichl a kol. 2004). U pěti druhů studovaných v této studii (*Bathyergus suillus* a *Georychus capensis*, *Fukomys damarensis*, *Cryptomys natalensis* a *Heliophobius argenteocinereus*) byla detekována ve všech čípcích exprese S-opsinu a jen velice slabá koexprese L-opsinu v některých S-čípčích (detekovaná exprese S-opsinu v nich byla daleko vyšší). Konvenční L-čípky nebyly nalezeny. Unikátní dominance S-čípků je tedy znakem sdíleným všemi druhy rypošů, bez ohledu na množství jejich nadzemní aktivity. *Bathyergus suillus* a *Georychus capensis* mají větší množství nervových vláken v optickém nervu (Němec a kol. 2007, 2008) a příležitostně využívají nadzemní zdroje potravy (Bennet a Faulkes 2000); distribuce fotoreceptorů je však u nich shodná s tímtež u ostatních druhů rypošů. Srovnání s fylogeneticky vzdálenými savci adaptovanými na podzemní způsob života navíc přesvědčivě demonstruje, že podzemní život je možný s velmi různou fotoreceptorovou výbavou. Mozaika fotoreceptorů bathyergidů je vhodná pro vidění za denních intenzit světla a nemůže být proto považována za adaptaci k podzemnímu vidění. Dané uspořádání sítnice tedy může být ancestrálním znakem získaným náhodou

(díky uvolnění stabilizujícího selekčního tlaku) nebo kauzálně spjata s jinou než sensorickou adaptací k podzemnímu způsobu života (např. s nízkou hladinou tyroidního hormonu).

Kompozice fotoreceptorové mozaiky je v souladu se současnými hypotézami, jež předpokládají, že rypoši nepoužívají zrak k orientaci v podzemí, ale k detekci poškození systému uzavřených podzemních tunelů, tedy jako součást antipredačního systému (Kott a kol. 2010, Němec a kol. 2007, 2008, Hetling a kol. 2005, Wegner a kol. 2006).

VIII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahnelt PK, Kolb H (2000) The mammalian photoreceptor mosaic – adaptative design. *Progr Ret Eye Res* 19: 711- 777

Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, Chun LLY, Falk JD, et al. (2000) The murine cone photoreceptor: A single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron* 27: 513–523.

Asenjo AB, Rim J a Oprian DD (1994) Molecular determinants of human red/green color discrimination. *Neuron* 12: 1131- 1138

Ballesteros JA, Weinstein H (1992) Analysis a refinement of predicting the structure a relative orientations of transmembraneal helical domains. *Biophys j* 62: 107- 109

Bennett NC, Faulkes CG (2000) African mole-rats: ecology and eusociality. Cambridge: Cambridge University Press. 287 p.

Bowmaker JK, Hunt DM (2006) Evolution of vertebrate visual pigments. *Curr Biol*: 484-489

Buffenstein R, Woodley R, Thomadakis C, Daly TJM, Gray DA (2001) Cold-induced changes in thyroid function in a poikilothermic mammal, the naked mole-rat . *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280:149-155

Buffenstein R (2005) The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. Nov;60(11):1369-77.

Buffenstein R, Pinto M (2008) Endocrine function in naturally long-living small mammals. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Feb 5;299(1):101-11.

Burda H, Bruns V, MüllerM (1990) Sensory adaptations in subterranean mammals. In: Nevo E, Reig OA (eds) *Evolution of subterranean mammals at the organismal a molecular levels*. Alan R. Liss, New York, 269– 294

Calderone, J.B. & Jacobs, G.H. (1995) Regional variations in the relative sensitivity to UV light in the mouse retina. *Vis. Neurosci.*, 12, 463-468.

Carter-Dawson, L.D. & LaVail, M.M. (1979) Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.*, 188, 245-262.

Cernuda-Cernuda R, DeGrip WJ, Cooper HM, Nevo E, García-Fernández JM (2002) The retina of *Spalax ehrenbergi*: novel histologic features supportive of a modified photosensory role. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2374– 2383

Cernuda-Cernuda R, García-Fernández JM, GordijnMCM, Bovee-Geurts PHM, DeGripWJ (2003) The eye of the African mole-rat *Cryptomys anelli*: to see or not to see? *Eur J Neurosci* 17: 709– 720

Cooper HM, Herbin M, Nevo E (1993a) Ocular regression conceals adaptive progression of the visual system in a blind subterranean mammal. *Nature* 361: 156– 159

Cooper HM, Herbin M, Nevo E (1993b) Visual system of a naturally microphthalmic mammal: the blind mole rat, *Spalax ehrenbergi*. *J Comp Neurol* 328: 313– 350

- Cowing JA, Poopalasundaram S, Wilkie SE, Robinson PR, Bowmaker JK a Hunt DM (2002) *Biochem. J.* 367: 129- 135
- David-Gray ZK, Bellingham J, Munoz M, Avivi A, Nevo E, Foster RG (2002) Adaptive loss of ultraviolet-sensitive/violet-sensitive (UVS/VS) cone opsin in the blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *Eur J Neurosci* 16: 1186– 1194
- David-Gray ZK, Janssen JWH, DeGrip WJ, Nevo E, Foster RG (1998) Light detection in a 'blind' mammal. *Nat Neurosci* 1: 655– 656
- Peichl, L., & Gonzales-Soriano, J. (1994). Unexpected presence of neurofilaments in axon-bearing horizontal cells of the mammalian retina. *Journal of Neuroscience*, 13, 4091–4100.
- Glaschke A, Glösmann M, Peichl L (2010) Developmental Changes of Cone Opsin Expression but Not Retinal Morphology in the Hypothyroid Pax8 Knockout Mouse. *IOVS*, Vol. 51, No. 3, 1719- 1727
- Glösmann M, Fliesser M, Ahnelt PK (1999) Cone opsin topography in the retina of the European mole. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 158
- Glösmann, M. & Ahnelt, P.K. (2002) A mouse-like retinal cone phenotype in the Syrian hamster: S opsin coexpressed with M opsin in a common cone photoreceptor. *Brain Res.*, 929, 139-146.
- Glösmann M, Steiner M, Peichl L, Ahnelt PK (2008) Cone photoreceptors and potential UV vision in a subterranean insectivore, the European mole. *Journal of vision* 8(4): 23, 1-12
- Hárosi FI (1994) An analysis of two spectral properties of vertebrate visual pigments. *Vision Res.* Jun;34(11):1359-67.
- Herbin M, Rio J-P, Repérant J, Cooper HM, Nevo E, Lemire M (1995) Ultrastructural study of the optic nerve in blind mole-rats (*Spalacidae*, *Spalax*). *Visual Neurosci* 12: 253– 261
- Hetling JR, Baig-Silva MS, Comer CM, Pardue MT, Samaan DY, et al. (2005) Features of visual function in the naked mole-rat *Heterocephalus glaber*. *J Comp Physiol A* 191: 317– 330.
- Hunt DM, Carvalho LS, Cowing JA, Parry JWL, Wilkie SE, et al. (2007) Spectral tuning of shortwave-sensitive visual pigments in vertebrates. *Photochem Photobiol* 83: 303–310.
- Chang BS, Craall KA, Carulli JP, Hartl DL (1995) Opsin phylogeny a evolution: a model for blue shifts in wavelength regulation. *Mol Phylogenet Evol*: 31- 43
- Cheng CL, Gan KJ, Novales Flamaricus (2009) Thyroid Hormone Induces a Time Dependent Opsin Switch in the Retina of Salmonid Fishes. *IOVS*, June 2009, Vol. 50, No. 6: 3024- 3032
- Ingram CM, Burda H and Honeycutt RL Molecular phylogenetics and taxonomy of the African mole-rats, genus *Cryptomys* and the new genus *Coetomys* Gray, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31 (2004) 997–1014

- Jacobs GH (1993) The distribution a nature of color vision among the mammals. *Biol Rev* 68: 413- 471
- Jacobs, G. H., Calderone, J. B., Fenwick, J. A., Krogh, K., & Williams, G. A. (2003). Visual adaptations in a diurnal rodent, *Octodon degus*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 189, 347–361.
- Jacobs GH, Rowe MP (2004) Evolution of vertebrate color vision. *Clin Exp Optom* 87: 206- 216
- Jacobs GH (2009) Evolution of colour vision in mammals. *Phil Trans R Soc B* 364: 2957–2967.
- Jeon C-J, Strettoi E, Masla RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18: 8936–8946
- Kosak, S.T., Scalzo, D., Alworth, S.V., Li, F., Palmer, S., Enver, T., Lee, J.S., and Groudine, M. (2007). Coordinate gene regulation during hematopoiesis is related to genomic organization. *PLoS Biol.* 5, e309.
- Kryger, Z., Galli-Resta, L., Jacobs, G.H. & Reese, B.E. (1998) The topography of rod and cone photoreceptors in the retina of the ground squirrel. *Vis. Neurosci.*, 15, 685-691.
- Lin SW, Kochendoerfer GG, Carroll KS, Wang D, Mathies RA, Sakmar TP (1998) Mechanisms of spectral tuning in blue cone visual pigments. Visible and raman spectroscopy of blue-shifted rhodopsin mutants. *J Biol Chem.* Sep 18;273(38):24583-91
- Lovegrove BG, Papenfus ME (1995) Circadian activity rhythms in the solitary cape mole-rat (*Georchus capensis*, Bathyergidae) with some evidence of splitting. *Physiol Behav* 58: 679–685.
- Lukáts A, Szabo A, Rohlich P, Vigh B, Szel A (2005) Photopigment coexpression in mammals: comparative and developmental aspects. *Histol Histopathol* 20: 551–574.
- Lyubarsky AL, Daniele LL, Pugh EN (2004) From candelas to photoisomerizations in the mouse eye by rhodopsin bleaching in situ and the light-rearing dependence of the major components of the mouse ERG. *Vision Res* 44: 3235–3251.
- Misteli, T. (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128, 787–800.
- Nathans J (1999) The evolution of physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigment. *Biochemistry* 43: 8014- 8020
- Nathans J (1990) Rhodopsin: structure, function, a genetics, *Biochemistry* 31: 4923- 4931
- Němec P, Cveková P, Burda H, Benada O, Peichl L (2007) Visual Systems a the Role of Vision in Subterranean Rodents: Diversity of Retinal Properties a Visual System Designs, *Subterranean Rodents: News from Underground* S. Begall, H. Burda, C.E. Schleich (Eds.), 131- 162
- Němec P, Cvekova´ P, Benada O, Wielkopolska E, Olkowicz S, et al. (2008) The visual system in subterranean African mole-rats (Rodentia, Bathyergidae): retina, subcortical visual nuclei and primary visual cortex. *Brain Res Bull* 75: 356–364.

- Nevo E (1999) Mosaic evolution of subterranean mammals: regression, progression a global convergence. Oxford Univ Press, Oxford
- Nikitina NV, Maughan-Brown B, O'Riain MJ, Kidson SH (2004) Postnatal development of the eye in the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). *Anat Rec* 277: 317– 337
- Nikonov, S. S., Kholodenko, R., Lem, J., & Pugh, E. N., Jr. (2006). Physiological features of the S- and M-cone photoreceptors of wild-type mice from single-cell recordings. *Journal of General Physiology*, 127, 359–374.
- Oelschläger HHA, Nakamura M, Herzog M, Burda H (2000) Visual system labeled by c-Fos immunohistochemistry after light exposure in the 'blind' subterranean Zambian mole-rat (*Cryptomys anelli*). *Brain Behav Evol* 55: 209– 220
- Oosthuizen MK, Bennett NC, Cooper HM (2005) Fos expression in the suprachiasmatic nucleus in response to light stimulation in a solitary and social species of African mole-rat (family Bathyergidae). *Neuroscience* 133: 555–560.
- Patzenhauerová H, Bryja J, Šumbera R (2010) Kinship structure and mating system in a solitary subterranean rodent, the silvery mole-rat. *Behav Ecol Sociobiol* 64: 757–767.
- Peichl, L., & González-Soriano, J. (1994). Unexpected presence of neurofilaments in axon-bearing horizontal cells of the mammalian retina. *Journal of Neuroscience*, 13, 4091–4100.
- Peichl, L. & Moutairou, K. (1998) Absence of short-wavelength-sensitive cones in the retinae of seals (Carnivora) and African giant rats (Rodentia). *Eur. J. Neurosci.*, 10, 2586-2594.
- Peichl L (2005) Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat a lifestyle? *Anat Rec* 287A: 1001– 1012
- Peichl L, Künzle H, Vogel P. 2000. Photoreceptor types a distributions in the retinae of insectivores. *Vi Neurosci* 17: 937– 948
- Peichl L, Němec P, Burda H (2004) Unusual cone a rod properties in subterranean African mole-rats (Rodentia, Bathyergidae). *Europ J Neurosci* 19: 1545– 1558
- Quilliam TA (1966) The problem of vision in the ecology of *Talpa europaea*. *Exp Eye Res* 5: 63– 78
- Rado R, Bronchti G, Wollberg Z, Terkel J (1992) Sensitivity to light of the blind mole rat: behavioural a neuroanatomical study. *Isr J Zool* 38: 323– 331
- Röhlich P, van Veen T, Szél A (1994) Two different visual pigments in one retinal cone cell. *Neuron*. Nov;13(5):1159-66
- Sanyal S, Jansen HG, DeGrip WJ, Nevo E, de Jong WW (1990) The eye of the blind mole rat, *Spalax ehrenbergi*: rudiment with hidden function? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1398- 1404
- Solovei I, Kreysing M, Lanctot C, Kosem S, Peichl L, et al. (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137: 356–368.

- Soucy E, Wang YS, Nirenberg S, Nathans J, Meister M (1998) A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Neuron* 21: 481–493.
- Sterling, P. (2003). How retinal circuits optimize the transfer of visual information. In *The Visual Neurosciences*, L.M. Chalupa and J.S. Werner, eds. (Cambridge, MA: MIT Press), pp. 234–259.
- Szél, Á. & Röhlich, P. (1992) Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp. Eye Res.*, 55, 47-52.
- Szél A, Röhlich P, Caffé AR a van Veen T (1996) Distribution of Cone Photoreceptors in the Mammalian Retina. *Mycrscopy Res a technique* 35:445-462
- Szél A, Röhlich P, Mieziowska K, Aguirre G, a van Veen T (1993) Spatial a temporal differences between the expression of short- a middle-wave sensitive cone pigments in the mouse retina: a developmental study, *J. Comp. Neurol.* 331: 564– 577
- Szél A, Lukáts A, Fekete T, Szepessy Z, Röhlich P (2000) Photoreceptor distribution in retinas of subprimate mammals, *J. Opt. Soc. Am.*: 568- 579
- Šklíba J, Šumbera R, Chitaukali WN (2008) Reactions to disturbances in the context of antipredatory behaviour in a solitary subterranean rodent. *J Ethol* 26: 249–254.
- Šklíba J, Šumbera R, Chitaukali WN, Burda H (2009) Home-range dynamics in a solitary subterranean rodent. *Ethology* 115: 217–226.
- Šklíba J, Šumbera R, Chitaukali WN, Burda H (2007) Determinants of daily activity patterns in a free-living afrotrropical solitary subterranean rodent. *J Mammal* 88: 1009–1016.
- Šumbera R, Burda H, Chitaukali WN, Kubová J (2003) Silvery mole-rats (*Heliophobius argenteocinereus*, Bathyergidae) change their burrow architecture seasonally. *Naturwissenschaften* 90: 370–373.
- Veldhoen K, Allison WT, Veldhoen N, Anholt BR, Helbing CC, Hawryshyn CW (2006) Spatio-temporal characterization of retinal opsin gene expression during thyroid hormone-induced and natural development of rainbow trout. *Visual Neuroscience*, 23, 169–179
- Vopalensky P, Kozmik Z. (2009) Eye evolution: common use and independent recruitment of genetic components. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009 Oct 12;364(1531):2819-32. Review.
- Wegner RE, Begall S, Burda H (2006) Light perception in “blind” subterranean Zambian mole-rats. *Anim Behav* 72: 1021– 1024
- Werner SJ, Nolte L, Provenza FD (2005) Proximal cues of pocket gopher burrow plugging behavior: Influence of light, burrow openings, and temperature, *Physiology & Behavior* 85 (2005) 340 – 345
- Williams, R.W., and Moody, S.A. (2003). Developmental and genetic control of cell number in the retina. In *The Visual Neurosciences*, L.M. Chalupa and J.S. Werner, eds. (Cambridge, MA: MIT Press), pp. 65–78.

Williams GA, Calderone JB, Jacobs GH (2005) Photoreceptors and photopigments in a subterranean rodent, the pocket gopher (*Thomomys bottae*). *J Comp Physiol A* 191: 125–13

Yokoyama S (2000). Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog Ret Eye Res* 19: 385- 419

Zhao H, Ru B, Teeling EC, Faulkes CG, Zhang S, Rossiter SJ (2009), Rhodopsin molecular evolution in mammals inhabiting low light environments. *PLoS One*. Dec 16;4(12):e8326.