

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Markéta Cimlerová

Patogeneze končetin u myši Sprouty2/Sprouty4

Pathogenesis of limbs in Sprouty2/Sprouty4 mice

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Mária Hovořáková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 26. 4. 2022

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych především poděkovala paní RNDr. Márii Hovořákové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Velmi si vážím jejího času, cenných rad a připomínek, a taktéž vstřícného přístupu, který mi věnovala během vypracovávání této práce.

Poděkování také patří kolegyním z Laboratoře experimentální embryologie, a to magistrám Lindě Dalecké, Zuzaně Pavlíkové, Kláře Steklíkové a paní Ivaně Koppové, za poskytnutí cenných rad a zkušeností během vypracování praktické části této práce. Za vytvoření microCT skenů předních končetin myši děkuji panu MUDr. MDDr. Martinu Bartošovi, Ph.D.

V neposlední řadě děkuji své rodině, partnerovi a přátelům za poskytnutí veškeré podpory v průběhu mého studia.

Finanční podpora

Tento projekt byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (21-04178S) a výzkumným programem Karlovy Univerzity (Progres Q25 a Q29).

Obsah

1	Úvod	10
2	Horní končetina člověka	12
2.1	Autopodium horní končetiny.....	12
2.2	Embryonální vývoj a růst lidské končetiny	14
3	Přední končetina myši	17
3.1	Autopodium přední končetiny myši	17
3.2	Embryonální vývoj a růst myši přední končetiny.....	18
4	Molekulární podstata tvorby končetin se zaměřením na dráhu fibroblastového růstového faktoru....	21
4.1	Tyrosinkinázový receptor	21
4.2	Fibroblastové růstové faktory	21
4.3	Receptory fibroblastových růstových faktorů	24
4.3.1	Receptor fibroblastového růstového faktoru 3	24
4.4	Sprouty proteiny.....	25
4.4.1	Sprouty2.....	27
4.4.2	Sprouty4.....	28
4.5	Sonic Hedgehog ve vztahu k vývoji končetin	29
5	Malformace horních končetin u člověka	31
5.1	Achondroplazie.....	31
5.2	Thanatoforická dysplazie	32
5.3	Hypochondroplazie.....	34
5.4	Rozštěp ruky	34
5.5	Syndaktylie a synostózy	37
6	Primární cilie a jejich funkce ve vývoji skeletu	39
6.1	Skeletální ciliopatie.....	40
7	Cíle diplomové práce.....	42

8	Materiál	43
8.1	Myší kmeny	43
9	Metody	45
9.1	Připouštění myší a odběr embryí.....	45
9.1.1	Mikropreparace	46
9.2	Odběr postnatálních jedinců	47
9.3	Genotypování	48
9.4	Histologické zpracování vzorků	49
9.5	Sledování buněčných linií	52
9.6	Výpočetní tomografie	53
10	Výsledky	54
10.1	Postnatální studie	54
10.1.1	Patologie autopodia předních končetin jedinců s genotypem <i>Spry2+/- Spry4-/-</i>	55
10.1.2	Jedinci <i>Spry2+/- Spry4-/-</i> bez zjevné patologie předních končetin	67
10.1.3	Patologie autopodia předních končetin jedinců s genotypem <i>Spry2+/- Spry4-/-</i>	68
10.2	Prenatální studie.....	73
10.2.1	Histologická analýza u prenatálních jedinců	85
10.3	Sledování populace exprimující <i>Shh</i> v ZPA u myší s normálním vývojem končetin	86
11	Diskuse	90
12	Závěry	97
13	Použitá literatura.....	98

Abstrakt

Sprouty proteiny hrají roli negativních regulátorů receptor tyrosin kináz (RTK), mezi něž se řadí i signální dráha fibroblastového růstové faktoru (FGF). Tato dráha je během embryonálního vývoje podstatná pro regulaci buněčné proliferace, migrace, diferenciace a apoptózy a její činnost je nepostradatelná pro normální vývoj končetin. Nedílnou součástí této dráhy jsou i receptory FGF (FGFR), z nichž ku příkladu FGFR3 významně ovlivňuje chondrocyty v růstové ploténce a jeho mutacemi dochází k rozvoji chondrodysplastických syndromů.

Sprouty proteiny mají významné role během vzniku tělesných tkání v procesu organogeneze. Bylo prokázáno, že Sprouty2 a Sprouty4 se uplatňují v tvorbě mnoha orgánů, jako je mozek, plíce, zuby, ale především také v tvorbě končetin. Sprouty2 je regulátor enchondrální osifikace, moduluje signalizaci v osteoblastech a chondrocytech a je podstatný pro normální proliferaci a diferenciaci chondrocytů. *Sprouty4* je exprimován v růstové zóně končetinového pupene. Narušení exprese genů *Sprouty2* a *Sprouty4* vede ke vzniku končetinových vad, což bylo dokázáno např. na myších či kuřecích embryích.

V předložené práci se zabýváme vývojem končetin transgenních myší s deficiencí Sprouty2/Sprouty4, u nichž byly v rámci preliminární studie detekovány mimo jiných vad i patologie předních končetin. Cílem práce je sledování longitudinálního vývoje končetin u Sprouty2/Sprouty4 deficientních myší se zaměřením na anatomicko-morfologické vyhodnocení fenotypových projevů deficience proteinů Sprouty2 a/nebo Sprouty4 na autopodiu předních končetin postnatálních jedinců, vyhodnocení vývoje patologií končetin u prenatalních jedinců a případné srovnání rozdílů ve vývoji patologií u jedinců s rozdílnými genotypy reflektujícími rozdílnou dávku deficience obou proteinů (*Sprouty2*^{+/-} *Sprouty4*^{-/-} a *Sprouty2*^{+/+} *Sprouty4*^{-/-}).

Klíčová slova: Sprouty2, Sprouty4, FGF signalizační dráha, patogeneze končetin, rozštěp ruky

Abstract

Sprouty proteins play the role of negative regulators of receptor tyrosine kinases (RTKs), including the fibroblast growth factor (FGF) signaling pathway. During embryonic development, this pathway is essential for the regulation of cell proliferation, migration, differentiation and apoptosis, and its activity is crucial for normal limb development. An integral part of this pathway are also FGF receptors (FGFR), of which, for example, FGFR3 significantly affects chondrocytes in the growth plate and its mutations lead to the development of chondrodysplastic syndromes.

Sprouty proteins play important roles during the formation of body tissues in the process of organogenesis. It has been shown that Sprouty2 and Sprouty4 are involved in the formation of many organs, such as the brain, lungs, teeth, but also in the formation of limbs. Sprouty2 is a regulator of enchondral ossification, modulates signaling in osteoblasts and chondrocytes and is essential for normal chondrocyte proliferation and differentiation. *Sprouty4* is expressed in the progress zone of the limb bud. Disruption of *Sprouty2* and *Sprouty4* gene expression leads to limb defects, which has been demonstrated, for example, in mouse or chicken embryos.

In the presented work we deal with the development of the limbs of transgenic mice with Sprouty2/Sprouty4 deficiency, in which, among other defects, pathologies of the forelimbs were detected in a preliminary study. The aim of this work is to monitor the longitudinal development of limbs in Sprouty2/Sprouty4 deficient mice with a focus on anatomical-morphological evaluation of phenotypic manifestations of Sprouty2 and/or Sprouty 4 protein deficiency on the anterior limb autopodium, evaluation of limb pathology in prenatal individuals and possible comparison of developmental differences of pathologies in individuals with different genotypes reflecting different dosages of both proteins (*Sprouty2*^{+/-} *Sprouty4*^{-/-} and *Sprouty2*^{+/+} *Sprouty4*^{-/-}).

Key words: Sprouty2, Sprouty4, FGF signalling pathway, limb pathogenesis, hand cleft

Seznam zkratek

3D	trojrozměrný (<i>three dimensional</i>)
AER	apikální ektodermová lišta (<i>apical ectodermal ridge</i>)
BM	kostní dřevina (<i>bone marrow</i>)
BMPs	kostní morfogenetické proteiny (<i>bone morphogenetic proteins</i>)
bp	páry bází (<i>base pair</i>)
CBL	<i>casitas B-lineage lymphoma</i>
Cre	Cre rekombináza
CT	výpočetní tomografie (<i>computed tomography</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dSpry	<i>Drosophila Sprouty</i>
ED	embryonální den
EEC syndrom	Ektrodaktylie-ektodermální dysplazie-rozštěpový syndrom (<i>Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-cleft syndrome</i>)
EGF	epidermální růstový faktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
etOH	ethanol
FGF	fibroblastový růstový faktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FGFR	receptor fibroblastového růstového faktoru
FRS2	<i>fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
g	gram
Gli	<i>Glioma-associated oncogene family zinc finger</i>
Gli3A	aktivační Gli3
Gli3R	represorový Gli3
GRB2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
h	hodina
Hh	Hedgehog
hSpry	lidský Sprouty
IFSSH	<i>International Federation of Societies for Surgery of the Hand</i>
IFT	intraflagelární transport (<i>intraflagellar transport</i>)
IFT-A	IFT komplex A

IFT-B	IFT komplex B
Ihh	Indian hedgehog
KO	genový knockout
KOH	hydroxid sodný
<i>LacZ</i>	gen pro Beta-galaktosidázu
LoxP	<i>Locus of chromosomal crossover (x) in the bacteriophage P1</i>
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MEK1/2	<i>mitogen-activated protein kinase 1/2</i>
mg	miligram
min	minuta
ml	mililitr
mm	milimetr
PBS	fosfátový pufr (<i>phosphate buffered saline</i>)
PFA	paraformaldehyd
PZ	růstová zóna (<i>progress zone</i>)
RA	kyselina retinová (<i>retinoic acid</i>)
RTK	receptor tyrosin kináza (<i>receptor tyrosine kinase</i>)
s	sekunda
S2	Sprouty2
S4	Sprouty4
SHFM	malformace rozštěp ruky/nohy (<i>Split-hand/split-foot malformation</i>)
Shh	Sonic hedgehog
SOS	<i>Son of sevenless</i>
Spry	Sprouty
SpryTD	Sprouty translokační doména
Sufu	<i>Supresor of fused</i>
UB	<i>ubiquitination</i>
WT	wild-type
ZPA	zóna polarizační aktivity (<i>zone of polarizing activity</i>)
μCT	mikro výpočetní tomografie (<i>micro computed tomography</i>)
μl	mikrolitr
μm	mikrometr

1 Úvod

Lidská horní končetina se skládá z více než 30 kostí a 50 svalů a dalších komponent jako jsou šlachy, vazy, nervy, kůže, nehty atp. Jedná se o velmi komplexní strukturu, jejíž vývoj je u člověka zahájen koncem čtvrtého týdne vývoje embrya, a to založením tzv. končetinových pupenů na ventrolaterální stěně embrya.

Tvorbu končetin během prenatalního vývoje reguluje řada signálních drah. Nejdůležitější pro raný vývoj končetin jsou dvě signalizační centra – apikální ektodermová lišta (AER) a zóna polarizační aktivity (ZPA). AER reguluje růst končetiny do délky pod kontrolou genů rodiny fibroblastových růstových faktorů (FGF), zatímco ZPA určuje předozadní orientaci končetiny pomocí signálu genu *Sonic hedgehog* (*Shh*). Bylo prokázáno, že defekty těchto center vedou k tvorbě vrozených končetinových vad s různorodým projevem.

Sprouty proteiny představují rodinu signálních molekul, které svou činností regulují expresi *FGF* a *Shh*. Obecně *Sprouty* geny působí jako negativní regulátory receptor tyrosin kináz (RTK), včetně *FGF*, a tímto mechanismem nepřímo ovlivňují i expresi *Shh*. Sprouty proteiny se významně uplatňují při vzniku tělesných tkání během organogeneze, geny *Sprouty2* (*Spry2*) a *Sprouty4* (*Spry4*) jsou exprimovány u různých vyvíjejících se orgánů a uplatňují se i během vývoje končetin. *Spry2* je podstatný regulátor enchondrální osifikace a moduluje signalizaci v osteoblastech a chondrocytech, zatímco *Spry4* se exprimuje v růstové zóně během vývoje končetinového pupene. Narušení exprese obou těchto genů vede ke vzniku končetinových vad, což bylo prokázáno např. na myších či kuřecích embryích.

Vrozené vady končetin u člověka, označované jako dysmelie, jsou vrozené deformity s frekvencí 6: 10 000 porodů, přičemž častěji je postižena horní končetina. Až 90 % případů má genetický původ, jedná se o defekty s familiárním výskytem, dědičností či přímou poruchou zárodečné tkáně. Zbývající vrozené vady mohou vzniknout na základě působení teratogenu, který se uplatní během kritické periody vývoje končetin. Vrozené vývojové vady končetin se mohou vyskytovat jako izolovaná forma nebo jako součást syndromu. Defekty mohou mít široké spektrum projevu. Může se jednat pouze o malé odchylky od běžné anatomické struktury, ale také o defekty s fatálními následky, jako je úmrtí plodu v prenatalním období nebo těsně po porodu.

Stále zůstává mnoho nezodpovězených klíčových otázek a podrobností o vývoji končetin, které je potřeba doplnit. Zejména pro praktické aplikace a terapeutické přístupy mohou být tyto podrobnosti velmi důležité. Například bychom mohli mluvit o cíli získat končetinové mezodermální buňky pro transplantace v případě oprav defektních končetin, či navrhnout

léčbu k napravení poškození defektních končetin pomocí stimulace tkání, které ji obklopují. Aby bylo možné dosáhnout těchto a dalších cílů, je zapotřebí, aby byly zcela pochopeny molekulární základy determinace, polarity a identity končetin a definování přesných sekvencí zúčastněných signálů.

V předložené práci se zaměřujeme na patologické stavy končetin, a to především v souvislosti s FGF a Shh signální dráhou. Smyslem této práce je popsat patologické stavy předních končetin u transgenních myší s deficiencí *Spry2/Spry4* a jejich vývoj s cílem vyhodnotit morfogenezi těchto patologií, a případné rozdíly v tvorbě patologií u jedinců s rozdílnými genotypy, tedy s různými dávkami proteinů Sprouty2 a/nebo Sprouty4.

2 Horní končetina člověka

Membrum superius (extremitas proximalis) neboli horní končetina, je pomocí pletence (*cingulum*) připojena k osově kostře. Pletenec je složen z lopatky (*scapula*) a kosti klíční (*clavicula*). Na pletenec je kloubně připojena volná končetina (*extremitas libera*), jež má tři základní části – stylopodium, zeugopodium a autopodium.

Kost pažní (*humerus*) představuje stylopodium, zeugopodium, u něhož hovoříme o kostech předloktí, je složeno ze dvou kostí – kosti vřetenní (*radius*) a kosti loketní (*ulna*). Kosti ruky představují autopodium horní končetiny.

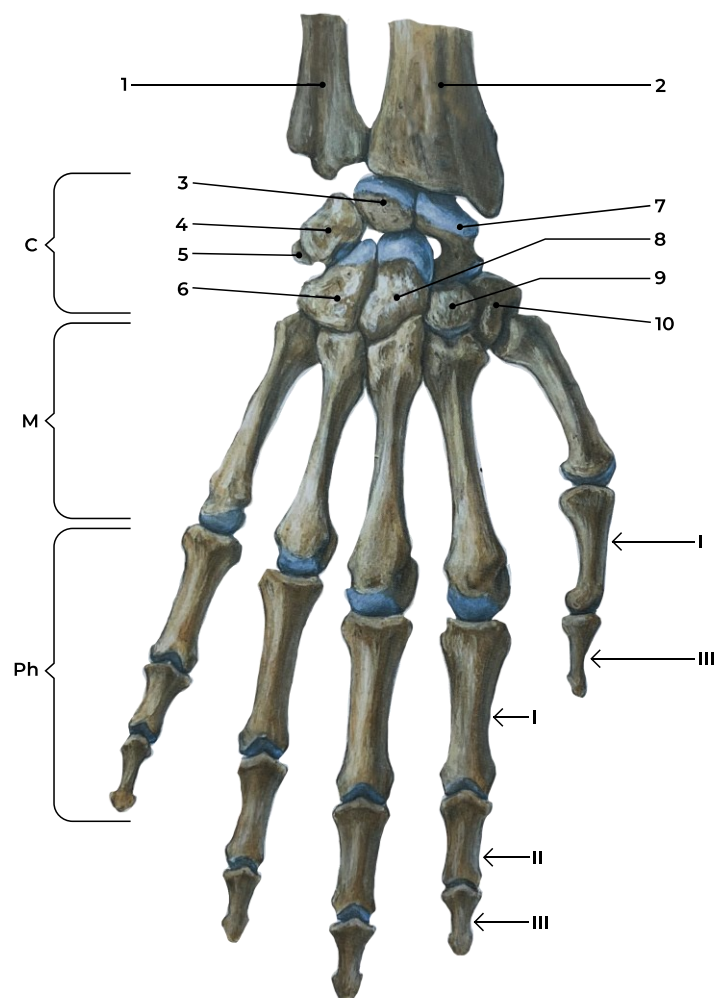
2.1 Autopodium horní končetiny

Autopodium (obr. 1) sestává ze tří částí – kosti zápěstí (*ossa carpi*), kosti záprstní (*ossa metacarpi*) a články prstů (*ossa digitorum manus, phalanges*). Ve šlachách se nachází malé sezamské kosti (*ossa sesamoidea*), jež se v lidské ruce nachází minimálně dvě v oblasti matakarpofalangového kloubu palce.

Kosti zápěstí – *ossa carpi*

Kosti zápěstí jsou uspořádané ve dvou řadách – proximální a distální, které jako celek vytvářejí zápěstí (*carpus*). V proximální řadě se nachází tyto kosti – kost člunková (*os scaphoideum*), kost poloměsíčitá (*os lunatum*), kost trojhranná (*os triquetrum*), kost hrášková (*os pisiforme*). Distální řadu tvoří tyto kosti – kost mnohohranná větší (*os trapezium*), kost mnohohranná menší (*os trapezoideum*), kost hlavatá (*os capitatum*) a kost hákovitá (*os hamatum*).

Jelikož karpální kosti představují krátký typ kostí, osifikace probíhá enchondrálně od středu k povrchu pouze z jednoho jádra u každé z nich. Všechny kosti jsou po narození chrupavčité a osifikace je postupná. Jako první osifikují v 1. roce věku *os capitatum* (od 2. měsíce po narození) a *os hamatum* (od 3. měsíce), později osifikuje *os triquetrum* (3. rok), *os lunatum* (4. rok), *os scaphoideum* a *os trapezium* (4.-5. rok), *os trapezoideum* (5.-6. rok) a jako poslední osifikuje *os pisiforme* (v závislosti na pohlaví v období mezi 7.-13. rokem).



Obrázek 1 **Kosti ruky, pravá strana, pohled na hřbetní stranu.** C: carpus (*ossa carpi*), M: metacarpus (*ossa metacarpi*), Ph: phalanges (*ossa digitorum*), 1: ulna, 2: radius, 3: *os lunatum*, 4: *os triquetrum*, 5: *os pisiforme*, 6: *os hamatum*, 7: *os scaphoideum*, 8: *os capitatum*, 9: *os trapezoideum*, 10: *os trapezium*, I: *phalanx proximalis*, II: *phalanx media*, III: *phalanx distalis* (upraveno podle Čihák, 2011).

Kosti záprstní – *ossa metacarpi*

Kosti záprstní distálně navazují na zápěstí a vytvářejí záprstí (*metakarpus*), což je oblast hřbetu ruky a dlaně. Jedná se celkově o pět kostí (*metakarpus I-V*) dlouhého typu. Každá záprstní kost má tři části – *basis* (báze, proximální část kosti), *corpus* (tělo, střední část) a *caput* (hlavice, distální konec).

Osifikace začíná již prenatálně (v období 9. týdne vývoje) v diafýzách záprstních kostí. Další osifikační centrum se objevuje v oblasti hlavice, případně u prvního metakarpu

v oblasti báze. Jedná se o tzv. monoepifýzové kosti, osifikující pouze z jedné epifýzy a z diafýzy. Epifýzy osifikují ve 2.-3. roce a k jejich splnutí s diafýzami dochází mezi 15. a 19. rokem, u dívek dříve než u chlapců.

Kosti prstů – *ossa digitorum*

Kostra prstů je tvořena články (*phalanges*), na prvním prstě jsou pouze dva články, na zbylých prstech jsou tři články (*phalanx proximalis*, *phalanx media* a *phalanx distalis*). Každý článek má tři části – *basis phalangis* (báze, proximální konec), *corpus phalangis* (tělo) a *caput phalangis* (hlavice, distální konec).

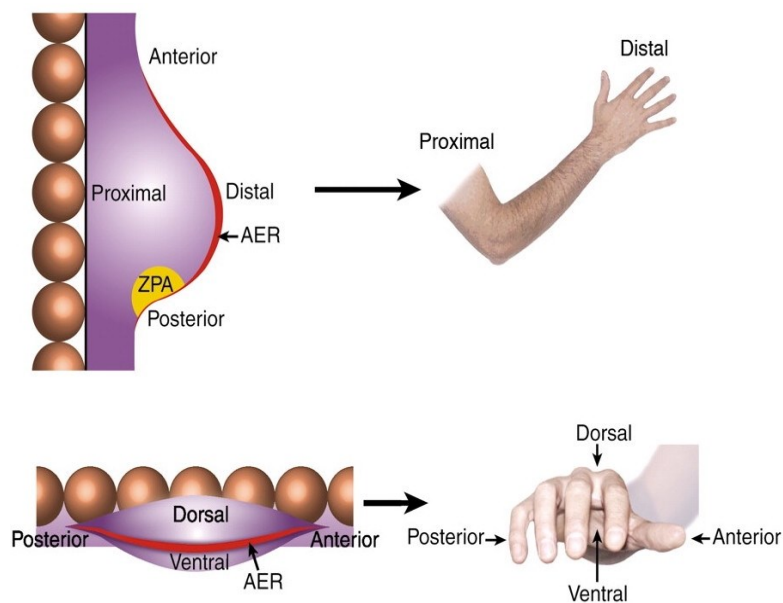
Osifikace článků prstů probíhá z diafýzy a jedné epifýzy u báze článku. Diafýzy začínají osifikovat prenatálně, nejdříve dochází k osifikaci v distálních člancích (8.-9. týden), následuje osifikace článků proximálních (10. týden) a naposledy mediálních (11. týden). Ve věku zhruba dvou let začínají osifikovat epifýzy proximálních článků, později středních článků a naposledy článků distálních. Ke srůstu diafýzy s epifýzami dochází mezi 15.-18. rokem věku jedince.

2.2 Embryonální vývoj a růst lidské končetiny

Horní končetiny se u lidského embrya začínají objevovat ve formě končetinových pupenů na konci 4. embryonálního týdne. Vytvářejí se na ventrolaterální straně těla a jsou tvořeny mezenchymem pocházejícím z mezodermy laterální ploténky. Na povrchu končetinového pupene se nachází ektoderm s kubickým epitelem, který se ztlušťuje a tvoří tzv. apikální ektodermovou lištu (Fallon & Kelley, 1977). Funkcí této struktury je indukce proliferace mezenchymových buněk, a tedy růstové zóny. Na udržení růstové zóny se podílejí fibroblastové růstové faktory 4 a 8 (FGF4 a FGF8), které jsou exprimovány v AER, a které řídí proximodistální osu vznikající končetiny (obr. 2) (Sun *et al.*, 2002; Mariani *et al.*, 2008).

Další významnou strukturou objevující se v raném vývoji, je zóna polarizační aktivity, která se podílí na určení anteroposteriorní osy končetin. Jedná se o skupinu buněk při zadním okraji končetiny, které produkují kyselinu retinovou (RA), jež je podstatnou složkou pro indukci končetinového pupene, a která spouští expresi genu *Shh* (Riddle *et al.*, 1993; Stratford *et al.*, 1996).

Signály produkované ektodermem řídí dorzoventrální osu končetin. Jedná se především o *Wnt7a*, který je produkovaný dorzálním ektodermem a kostními



Obrázek 2 **Tři primární osy uplatňující se při vzniku horní končetiny.** Horní obrázek znázorňuje AER (červeně), který probíhá na distálním konci končetiny a uplatňuje se při rozvoji končetiny v proximodistální ose. Posteriočně se nacházejí buňky ZPA (žlutě), které jsou podstatné při tvorbě anteroposteriorní osy končetiny. Dolní obrázek zobrazuje polohu AER, jež dělí ektoderm na dorzální a ventrální (převzato z Logan, 2003).

morfogenetickými proteiny (BMPs – *bone morphogenetic proteins*), pocházejícími z ventrálního ektodermu (Parr & McMahon, 1995; Pizette *et al.*, 2001).

Během počátku 6. týdne vývoje se končetinový pupen oplošťuje a odděluje se cirkulárním zaškrcením, čímž vzniká základ autopodia. Během další fáze vývoje dojde k druhému zaškrcení, které dává vznik dvěma odděleným částem – stylopodiū a zeugopodiū. Vznik paprsků prstů a štěrbin mezi nimi je podmíněn apoptózou v oblasti AER v místech budoucích meziprstních prostor.

Od 6. týdne vývoje zárodku vznikají první chrupavčité modely budoucích kostí diferenciací mezenchymu končetinových pupenů v chondrocyty. Chondrifikace u horních končetin probíhá proximodistálním směrem a je následována vývojem kloubů. Od konce embryonálního období, tedy od konce 8. týdne, je zahájena chondrogenní osifikace. Od 12. týdne začínají vznikat primární osifikační centra v diafýzách dlouhých kostí. Nejdříve osifikuje povrch diafýzy dějem nazývaným perichondrální osifikace. V centru diafýzy vzniká primární osifikační jádro, ze kterého osifikace pokračuje směrem k epifýzám chrupavčitého modelu. Vznik sekundárních osifikačních center probíhá postnatálně ve vlastním tempu každé kosti. Během růstového období přetrvává mezi diafýzou a

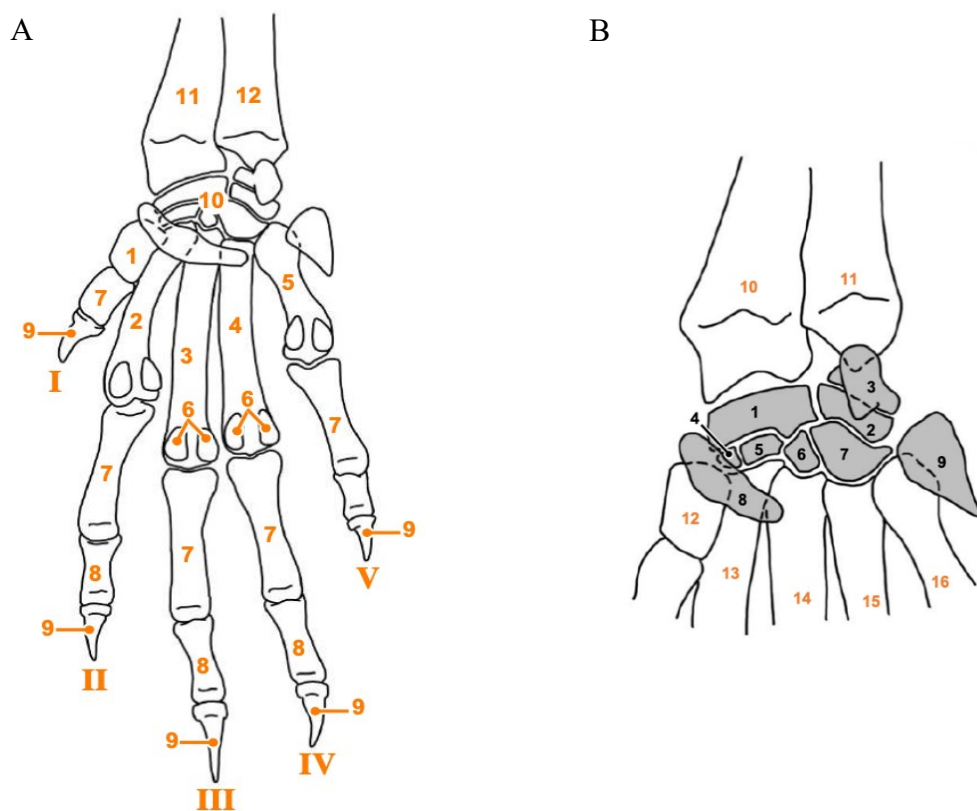
epifýzami specifická chrupavčitá ploténka, tzv. epifýzová (růstová) ploténka, v níž dochází k růstu kosti do délky. Počet růstových plotének se odvíjí od typu kosti (př. monoepifýzové, diepifýzové kosti). U dlouhých kostí je tato ploténka na proximálním i distálním konci mezi diafýzou a epifýzami, u krátkých kostí se nachází pouze jedna ploténka a kosti nepravidelného tvaru mají rozličný počet osifikačních center.

3 Přední končetina myši

Přední končetina myši se svou základní stavbou velmi podobá lidské horní končetině. Končetinu můžeme rozdělit na tři hlavní části – stylopodium, zeugopodium a autopodium. Nejproximálněji se nachází kost pažní (*humerus*), zeugopodium tvoří kost vřetenní (*radius*) a kost loketní (*ulna*). Autopodium je složeno z kostí zápěstních (*ossa carpi*), kostí záprstních (*ossa metacarpi*) a prstů (*phalanges digitorum*; obr. 3A).

3.1 Autopodium přední končetiny myši

Svým uspořádáním se kosti myšího autopodia téměř neliší od lidského (viz výše).



Obrázek 3 Názorný přehled kostí autopodia pravé přední končetiny myši (dorzo-ventrální pohled).

A) Autopodium a část zeugopodia přední končetiny. I-V: počet prstů, 1-5: metakarpální kosti, 6: sezamské kosti, 7: proximální článek prstu, 8: mediální článek prstu, 9: distální článek prstu, 10: zápěstí, 11: kost vřetenní, 12: kost loketní. **B) Kostí zápěstí.** 1: fúze intermedioradiální karpální kosti (*os scapholunatum*) a centrální karpální kosti (*os centrale carpi*), 2: ulnární karpální kost (*os triquetrum*), 3: přídavná karpální kost (*os pisiforme*), 4: první karpální kost (*os trapezium*), 5: druhá karpální kost (*os trapezoideum*), 6: třetí karpální kost (*os lunatum*), 7: čtvrtá karpální kost (*os hamatum*), 8: falciformní karpální kost, 9: ulnární sezamská kost, 10: kost vřetenní, 11: kost loketní, 12-16: metakarpální kosti (upraveno podle Ruberte *et al.*, 2021).

Kosti zápěstí

Do této skupiny kostí se řadí (radio-ulnárně) *os hamatum*, *os capitatum*, *os trapezoideum*, *os trapezium* v distální řadě a v proximální řadě jsou uloženy *os triquetrum*, *os pisiforme* (uložená na palmární straně *os triquetrum*), *os lunatum*, *os scaphoideum* a *os centrale carpi*, které spolu fúzují a *os falciforme carpi*. Na ulnární straně autopodia je přítomná ulnární sezamská kost.

V oblasti zápěstí dochází k anatomickým variacím v počtu karpálních kostí, ale také jejich fúzování. U většiny jedinců dochází k fúzování *os lunatum* a *os scaphoideum*, přičemž vzniká *os scapholunatum*. Tato kost nadále může fúzovat i s *os centrale carpi*. U některých jedinců může taktéž docházet k fúzování druhé a centrální karpální kosti (*os trapezoideum* a *os carpale centrale*; obr. 3B) (Ruberte *et al.*, 2021).

Kosti záprstní

Na myší kostře rozeznáváme taktéž pět kostí záprstních (*metacarpus I-V*). V oblasti metakarpofalangových kloubů druhého až pátého prstu se na palmární straně nachází dvě kosti sezamské, čímž se liší od lidského autopodia horní končetiny.

Kosti prstů

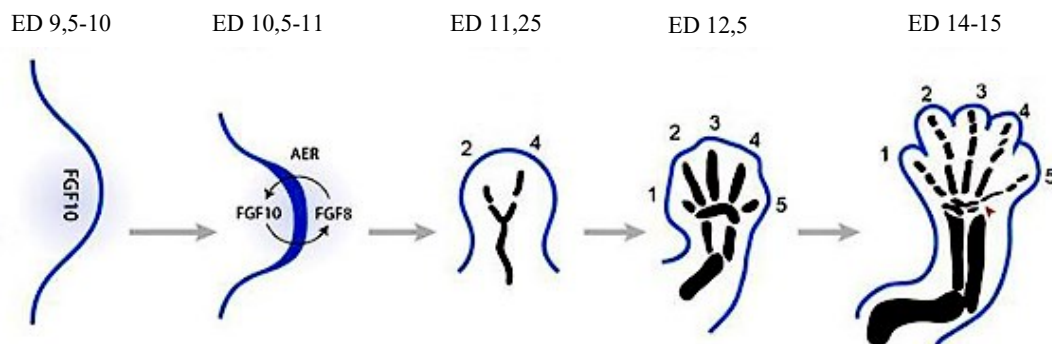
Druhý až pátý prst se skládají ze tří článků (proximálního, mediálního a distálního), první prst je složen pouze ze dvou článků (proximálního a distálního) (Kaufman, 1992).

3.2 Embryonální vývoj a růst myší přední končetiny

Embryonální vývoj myši trvá 18-20 dnů, přičemž k vzniku končetinových pupenů předních končetin dochází přibližně v 9. den vývoje. Zadní končetinové pupeny se rozvíjí o jeden embryonální den později (Hedrich, 2012).

Končetiny vznikají párovým pučením tkáně ze somatické laterální ploténky mezodermu, který během předchozího vývoje vznikl rozdělením laterální destičky mezodermu na somatickou (dorzální) a splanchnickou (ventrální) část. Růst a formování končetinových pupenů je řízen několika signálními centry, a to de facto podobně jako u člověka v AER a v ZPA v oblasti posteriorního mezenchymu končetinového pupene (Logan, 2003), jelikož většina poznatků o lidské embryogenezi končetin z hlediska molekulárního byla získána právě na myším modelu savčího vývoje.

Iniciátor růstu končetinového pupene je fibroblastový růstový faktor 10 (FGF10; obr. 4), který je indukován v mezodermu laterální ploténky, a také přetrvává v mezenchymu vytvořeného končetinového pupene a interaguje s FGF8 z AER a Shh ze ZPA (Ohuchi *et al.*, 1997). *Shh* je exprimován na zadním okraji předního končetinového pupene myši mezi 9,5 a 12,0 embryonálním dnem (ED), pro zadní končetinový pupen je perioda exprese *Shh* o půl dne opožděná, tedy mezi ED 10-12,5 (Zhu *et al.*, 2008). Během indukce končetin je mezi FGF8 a FGF10 nezbytná reciproční regulační smyčka, která je řízena signálem z receptoru fibroblastového růstového faktoru 2 (FGFR2) (Xu *et al.*, 1998). FGF a *Shh* vzájemně interagují a umožňují formování končetinového pupene ve směru proximodistálním a anteroposteriorním. Prodlužování končetinového pupene se děje proliferací mezenchymu v oblasti růstové zóny (*progress zone*), nacházející se pod AER.



Obrázek 4 Časové znázornění vzniku přední končetiny u myši (ED 9,5-15). ED 9,5-10: zahájení růstu končetinového pupene za působení FGF10, ED 10,5-11: formování AER za působení faktorů FGF8 a FGF10, zahájení exprese *Shh*, ED 11,25: počátek vzniku prstů v pořadí 4,2,3,5,1, počátek chondrogeneze, ED 12,5: patrné všechny prsty, ED 14-15: počátek formování kloubů a oddělení jednotlivých prstů (upraveno podle Baldock *et al.*, 2015).

Od ED 11,5 začínají vznikat základy prstů, jejichž tvorba se řídí přesným časovým vzorcem. Bylo zjištěno, že jako první je zakládán čtvrtý prst, jehož vznik je následován tvorbou druhého prstu. Později vzniká pátý a třetí prst, jako poslední se rozvíjí prst první (Zhu *et al.*, 2008). V ED 12,5 jsou patrné záhyby na distálním konci končetiny, jež odpovídají budoucímu umístění prstů. V ED 12,5-13 je poprvé vymezena oblast karpálních kostí a jsou přítomné paprsky prstů oddělené meziprstními štěrbinami. Od ED 13,5 jsou jasně přítomné oddělující se prsty prostřednictvím apoptózy v oblasti meziprstních štěrbin. V ED 14,5 jsou všechny prsty rozprostřeny do šířky, avšak v ED 16,5 se prsty 2-5 dostávají do paralelního uspořádání (Kaufman, 1992).

Během embryogeneze začíná vývoj kostí kondenzací mezenchymálních progenitorových buněk v místě vzniku budoucí kosti. Kosti axiálního skeletu jsou odvozeny ze somitů, přičemž jsou později formovány procesem enchondrální osifikace.

Osifikační centra kostí přední končetiny se objevují v předvídatelné posloupnosti i čase. Primární osifikační centrum lopatky se objevuje 15. ED, sekundární osifikační centrum bylo zaznamenáno v postnatálním období (7. den po narození), nicméně ještě 14 dnů po narození není lopatka zcela osifikována. Od 15. ED se také rozvíjí primární osifikační centrum kosti pažní, jejíž sekundární centra se začínají objevovat 7. den po narození. U kosti vřetenní i kosti loketní je osifikace zahájena také 15. ED, sekundární osifikační centra se objevují 7. (distální konec) a 14. (proximální konec) den po narození (Patton & Kaufman, 1995).

Kosti zápěstní mají přítomna primární osifikační centra až 7. den po narození. Kosti metakarpální osifikují v pořadí 3, 4, 2, 5 a 1. Všechny kosti metakarpální mají primární osifikační centra přítomna 19. ED s výjimkou prvního metakarpu, který osifikuje cca 7 dnů po narození. Sekundární osifikační centra se objevují od 7. dne po narození, a to v pořadí 2, 3, 4 a 5, přičemž v této době není žádné centrum přítomné u 1. metakarpu (Patton & Kaufman, 1995).

Osifikace článků prstů probíhá různorodě. Distální článek prvního prstu osifikuje ve stejnou dobu jako distální články ostatních prstů (ED 18,5), zatímco první metakarpální kost a proximální článek prstu osifikují až nejdříve 7 dnů po narození. Primární osifikační centra ostatních prstů se objevují zhruba od 18. ED. Mediální články prstů osifikují jeden den po porodu a jejich sekundární osifikační centra se objevují nejdříve na proximálním konci 7. den po narození, stejně tak se objevují i u prostředních článků. Distální články osifikují mezi 18. a 19. ED a nejsou u nich patrná sekundární osifikační centra (Patton & Kaufman, 1995).

Zajímavé je, že na rozdíl od člověka, u myši dochází k přírůstku kostní hmoty a pokračování longitudinálního růstu kostí i po dosažení pohlavní dospělosti, což je v 6-8 týdnech. U myši se podélný růst dramaticky zpomaluje na velmi nízkou úroveň v pubertě, ale růstové ploténky se úplně nespojí a nezmizí (Jilka, 2013).

4 Molekulární podstata tvorby končetin se zaměřením na dráhu fibroblastového růstového faktoru

Vznik končetin obratlovců je velmi komplexní proces, který probíhá na základě koordinace tří signalizačních oblastí končetinového pupene – AER, ZPA a ventrálního a dorzální ektodermu. Jednotlivé signalizační molekuly (FGF, Shh, Wnt7a, BMPs a Engreild1), jsou na sobě závislé a ovlivňují se pomocí zpětnovazebných smyček. Toto základní schéma vývoje se uplatňuje při tvorbě končetin všech obratlovců, a proto je možné využívat pro další bádání v této oblasti zájmu především myšího a kuřecího modelu.

V níže uvedených kapitolách se podrobněji věnuji především molekulární dráze FGF, v jejímž průběhu se uplatňují jako negativní regulátory Sprouty proteiny. Jedna z kapitol je také věnována Shh, jelikož v souvislosti se změnami exprese *Shh* a signalizační aktivity byly zaznamenány vážné defekty autopodia u myši i lidí zahrnující jak polydaktylii, tak oligodaktylii (Masuya *et al.*, 1995; Chiang *et al.*, 1996). Vývoj a růst končetin obratlovců jsou řízeny vzájemnými interakcemi těchto dvou signalizačních drah, které fungují v závislosti na zpětnovazebné smyčce. Pokud dojde k jejímu narušení, dochází k selhání formování distálních částí končetin, především prstů (Zúñiga *et al.*, 1999).

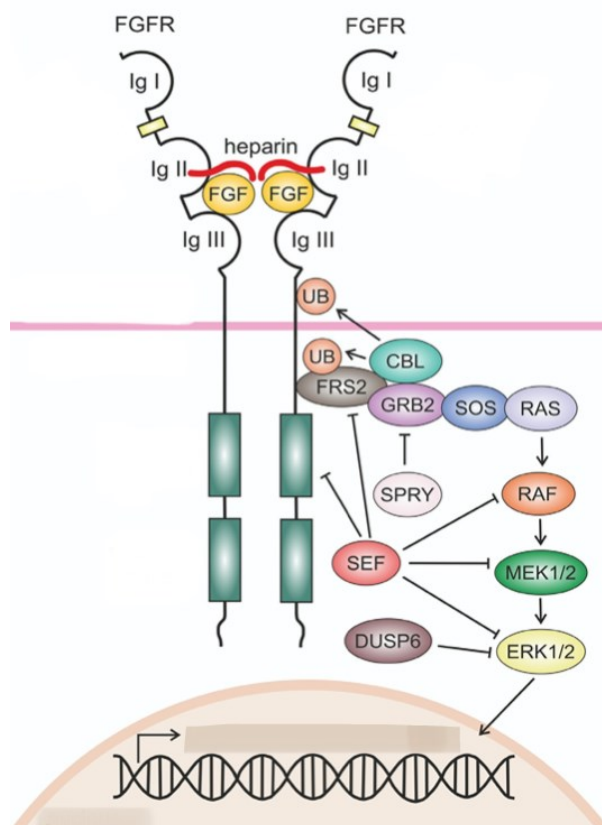
4.1 Tyrosinkinázový receptor

Signalizační dráhy tyrosin kinázového receptoru jsou prostorově i časově regulovány řadou pozitivních a negativních regulačních mechanismů, které řídí amplitudu a dobu trvání signálů iniciovaných na buněčném povrchu tak, aby při jejich uplatnění docházelo k normálnímu biologickému vývoji, případně odchylce při onemocnění. Mezi významné modulátory RTK je řazena rodina Sprouty proteinů (Reich *et al.*, 1999).

Jednotlivé proteiny ze superrodiny receptor tyrosinových kináz hrají podstatnou roli během embryonálního vývoje a také při postnatální remodelaci kostní tkáně. Konkrétně se významně uplatňují v proliferaci a diferenciaci chondrocytů, osteoblastů, osteoklastů a dalších kostních buněk (Ornitz, 2005).

4.2 Fibroblastové růstové faktory

FGF tvoří evolučně konzervovanou rodinu proteinů. U obratlovců je dnes známa rodina 22 proteinů, které aktivují receptory fibroblastových růstových faktorů (FGFR), jež



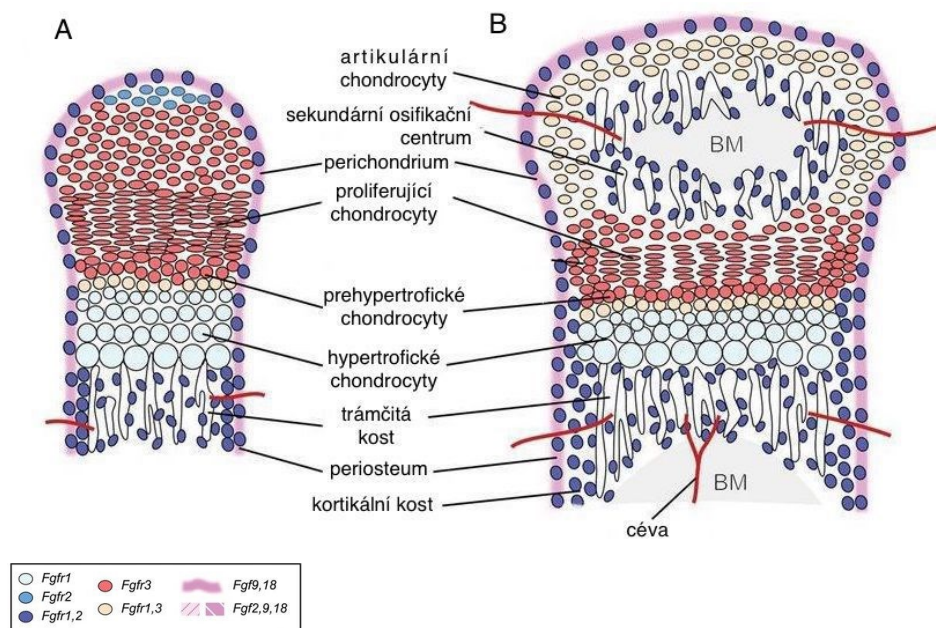
Obrázek 5 **Signalizační dráha FGF/ERK**. Signální dráha FGF/ERK je zahájena po vysokoafinní vazbě molekuly ligandu FGF na příslušný receptor – FGFR. Následuje konformační změna FGFR, která je klíčová pro aktivaci receptorové kinázové domény a rekrutování adaptorových proteinů, které spojují FGF dráhu s MAPK. Jako první skafoldový protein je uplatněn FRS2, následovaný druhým proteinem GRB2. Spolu se SOS vytváří signální komplex, který je translokován poblíž plazmatické membrány, kde se váže na doposud neaktivní RAS (Ong *et al.*, 2000). Po aktivaci je RAS od komplexu disociován a rekrutuje svůj efektorový protein RAF, jež svou aktivací fosforyluje první kinázy kaskády MAPK, nazývané MEK1 a 2. Ty váží a fosforylují ERK1 a 2, které jsou poslední kinázovou molekulou kinázové kaskády (Kouhara *et al.*, 1997). ERK se translokují do jádra, kde aktivují transkripční proteinů s rozličnými biologickými funkcemi. Příslušná buněčná odpověď je výsledkem FGF signalizace. Tato signalizační kaskáda je regulována v mnoha úrovních. Významnou skupinou antagonistů této kaskády jsou Sprouty proteiny (SPRY). Pod vlivem FGF jsou SPRY fosforylovány, což vede k navázání adaptorových proteinů (GRB2), a ten je tak disociován z komplexu FRS2/GRB2/SOS, čímž dojde k zeslabení signalizace. Na této úrovni funguje také CBL, který spouští ubikvitinaci (UB) a následnou degradaci aktivovaného FGFR a FRS2 (upraveno podle Soszyńska *et al.*, 2019).

mají tyrosinkinázovou aktivitu a jsou schopny aktivovat příslušné signalizační kaskády (Ornitz & Itoh, 2001).

Veškeré FGF proteiny mají vysokou afinitu pro heparin (Bugess & Maciag, 1989), za jehož působení dochází ke spojení dvou FGF-vázajících podjednotek FGFR, což je

důležitý krok pro aktivování receptoru a sestavení stabilního a specifického komplexu FGF-FGFR (Schlessinger *et al.*, 2000). Přenos signálu se děje prostřednictvím čtyř signalizačních kaskád, z nichž nejlépe probádanou je MAPK, která zahrnuje ERK (obr. 5). Jedním z antagonistů FGF dráhy jsou právě Sprouty proteiny, které jsou regulovány fosforylací na konzervovaném tyrosinovém zbytku, čímž vzniká prostor pro navázání adaptorového proteinu (GRB2) a následného rozpadu komplexu FRS2/GRB2/SOS a oslabení signalizace (Mason *et al.*, 2004; Kim & Bar-Sagi, 2004).

Během embryonálního vývoje hrají FGF roli v regulaci buněčné proliferace, migrace, diferenciace a apoptózy. FGF signalizace je podstatná téměř ve všech fázích vývoje končetin. Konkrétně se jedná o regulaci vývoje končetinového pupene a udržování jeho růstu, dále na formování končetiny a růst dlouhých kostí (Martin, 1998). FGF signály hrají klíčovou roli v regulaci chondrogenese, osteogeneze, kostní a minerální homeostáze. Přehled jednotlivých FGF a FGFR uplatňujících se během enchondrálního vývoje kosti je zobrazen na obr. 6.



Obrázek 6 **FGF a FGFR** exprese během enchondrálního vývoje kosti. A) Embryonální růstová ploténka. B) Postnatální růstová ploténka po vytvoření sekundárního osifikačního centra. BM – kostní dřeň (*bone marrow*) (upraveno podle Ornitz & Marie, 2015).

Předpokládá se, že jako nezbytný iniciátor tvorby končetinového pupene funguje FGF10 (Sekine *et al.*, 1999). Pro normální vývoj končetin je nepostradatelná exprese *FGF8*, jehož inaktivace vede k redukci velikosti končetin (Lewandoski *et al.*, 2000). Nedostatečná

exprese *FGF8* v AER ústí ve změny exprese dalších FGF genů a *Shh* (Moon & Capecchi, 2000).

4.3 Receptory fibroblastových růstových faktorů

FGFR jsou transmembránové tyrosinkinázové receptory, jež jsou součástí signalizačních drah FGF a jsou nedílnou součástí vývoje končetin. U obratlovců byly identifikovány čtyři FGFR (FGFR1-4), přičemž později byl objeven další receptor FGFR5, který je ovšem unikátní tím, že neobsahuje intracelulární tyrosinkinázovou doménu, která je běžná ve výše uvedených FGFR1-4 (Sleeman *et al.* 2001).

Během tvorby končetin se FGFR exprimují rozdílně. Během časně diferenciaci končetin se FGFR1 exprimuje difúzně v mezenchymu končetinového pupene, zatímco FGFR2 se exprimuje v ektodermu, včetně AER. Později dochází k současné expresi FGFR1 a FGFR2 v blastému chrupavky (Peters *et al.*, 1992). Končetinové pupeny FGFR1 deficientních myších embryí byly vývojově retardované a vykazovaly abnormální tvar (Deng *et al.*, 1997). FGFR2 je nezbytným zprostředkovatelem reciproční regulační smyčky mezi FGF8 a FGF10 během indukce končetin (Xu *et al.*, 1998). V případě Apertova syndromu, který se mimo jiné projevuje závažnými formami syndaktylie, vznikající fúzí kostí i kloubních spojů prstů, dochází ke ztrátě specificity vazby ligandu na FGFR2 (Yu *et al.*, 2000).

S mutacemi FGFR je spojováno nesčetně dalších vrozených vad, které často zahrnují nesprávnou fúzi lebečních švů či abnormality skeletu. Mutace dvou členů této rodiny, konkrétně FGFR1 a FGFR2, jsou spojovány se vznikem lidských onemocnění končetin v souvislosti s chybným formováním končetin, jak již bylo zmíněno výše, zatímco mutace FGFR3 ovlivňuje růst kostí končetin (Wilkie *et al.*, 2002). Mutace FGFR1, 2 a 3 se mohou v klinickém obraze pacienta překrývat, což naznačuje, že mohou mít překrývající se funkce, a tudíž se i částečně vzájemně kompenzovat (Burke *et al.*, 1998).

4.3.1 Receptor fibroblastového růstového faktoru 3

FGFR3 je funkčně jeden z nejdůležitějších negativních regulátorů lineárního růstu kostí, který je exprimován v růstových ploténkách dlouhých kostí (Deng *et al.*, 1996). FGF/FGFR3 signalizace hraje nepostradatelnou roli během enchondrální osifikace, a to jak během chondrogenese, tak i osteogenese (Chen *et al.*, 1999). Prostřednictvím FGFR3 může být podpořena diferenciaci prechondrogenních mezenchymálních buněk na chondrocyty,

kteře produkují chrupavku, a tím tedy dochází k podpořeni její tvorby (Davidson *et al.*, 2005).

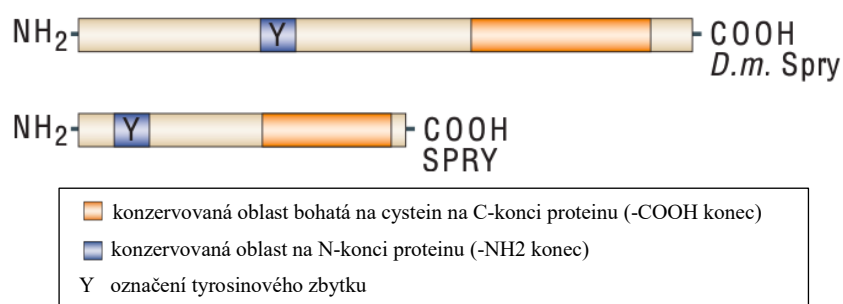
Dominantně dědičné mutace genu tohoto receptoru mají za následek onemocnění kosterní soustavy nazývané jako achondroplazie, hypochondroplazie a thanatoforní dysplazie (Horton & Lunstrum, 2002). U těchto onemocnění dochází k poruše enchondrální osifikace kostí, což bylo zjištěno na myších embryích, která již 12. den embryonálního vývoje vykazovala inhibici enchondrální osifikace a mutace vedly k přímému účinku na proliferaci i zrání chondrocytů (Segev *et al.*, 2000).

Bylo zjištěno, že defekty růstové ploténky připisované dwarfismům souvisejícím s FGFR3 mutacemi mohou být potenciálně způsobeny ztrátou funkce primárních cílů. Tím pádem by tato kategorie malformací představovala novou skupinu onemocnění kosterní soustavy související s defektní ciliogenezi (Martin *et al.*, 2018). Přítomnost odchýlných primárních řasinek v růstových ploténkách byla nalezena u achondroplazie a thanatoforní dysplazie. Tím se tato onemocnění podobají skeletálním ciliopatiím, u nichž je funkce primárních řasinek narušena a dochází k abnormálnímu růstu kostí. Také bylo prokázáno, že dysregulace cílů v chondrocytech u těchto onemocnění pramení z přímého působení FGFR3. To by mohlo naznačovat, že defektní signalizace mezi cíliemi a Hedgehog rodinou růstových faktorů hraje podstatnou roli při vzniku skeletálních dysplázií souvisejících s FGFR3 (Kunova Bosakova *et al.*, 2018).

4.4 Sprouty proteiny

Sprouty proteiny představují rodinu signálních molekul, které byly poprvé popsány jako antagonisté fibroblastového růstového faktoru uplatňující se v signalizačních drahách během vývoje tracheálního systému u *Drosophila melanogaster* (*dSpry*) (Hacohen *et al.*, 1998). Homologické Sprouty proteiny byly nalezeny i u obratlovců. V myším a lidském genomu byly identifikovány čtyři *Sprouty* geny: *Spry1*, *2*, *3* a *4* (de Maximy *et al.*, 1999, Leeksma *et al.*, 2002).

Protein (dSpry) nalezený u *Drosophila melanogaster* je veliký 63 kDa a obsahuje unikátní 124 jednotek dlouhý region, který je bohatý na cystein. Homologické Sprouty proteiny u člověka (hSpry) i myši jsou podstatně menší velikosti (32–34 kDa) oproti dSpry a mimo shodu v konzervované oblasti bohaté na cystein vykazují dSpry a savčí Sprouty proteiny minimální shodu. Výjimku tvoří pouze jedna sekvenční oblast obsahující tyrosinový zbytek, která je shodná u dSpry a savčích Sprouty (obr. 7). Divergence sekvencí na aminokyselinovém konci jednotlivých savčích Sprouty určuje jejich rozličné funkce, a především schopnost interagovat ve vazbách protein-protein (Kim & Bar-Sagi, 2004).



Obrázek 7 Grafické znázornění konzervovaných domén Sprouty proteinu u *Drosophila melanogaster* (*D.m. Spry*) a u savčího typu (SPRY). Oba proteiny obsahují konzervovanou oblast bohatou na cystein na karboxylovém konci (-COOH konec), avšak na svém aminokyselinovém konci (-NH₂) mají pouze jednu krátkou sekvenčně podobnou oblast zahrnující konzervovaný tyrosinový zbytek (upraveno podle Kim & Bar-Sagi, 2004).

Dle původního výzkumu bylo stanoveno, že Sprouty jsou extracelulární proteiny (Hacohen *et al.*, 1998), nicméně závěrem jedné z dalších provedených studií bylo, že Sprouty jsou intracelulární proteiny, které přímo interagují s několika členy Ras/MAP kinázových kaskád, které jsou nezbytné pro řadu vývojových procesů iniciovaných aktivací různých receptor kinázových drah. Sprouty působí jako inhibitory zapojené do negativní zpětné vazby signalizace ve více kontextech a řadí se tak dosud mezi nejrozšířenější inhibitory signalizace Ras/MAP kinázy (MAPK) u *Drosophily* (Casici *et al.*, 1999).

Dále bylo prokázáno, že Sprouty proteiny fungují jako obecné inhibitory receptor kinázových drah a účastní se interakcí s negativní zpětnou vazbou během rozličných biologických procesů u savců (Reich *et al.*, 1999). V některých dalších tkáních a orgánech (např. v oku) jsou Sprouty proteiny zapojeny také do drah receptorů epidermálního růstového faktoru (EGFR) (Casici *et al.*, 1999). U bezobratlých i obratlovců jsou tyto

extracelulární signální faktory – FGF a epidermální růstový faktor (EGF) zapojeny do obecné morfogeneze, buněčné proliferace a diferenciaci (Kramer *et al.*, 1999).

Pokud je buňka stimulovaná buď FGF nebo EGF, Sprouty proteiny jsou schopny se translokovat do oblasti plazmatické membrány a tím se aktivovat. Tento děj probíhá díky konzervované C-koncové oblasti označované jako Sprouty translokační doména (SpryTD) (Lim *et al.*, 2000). Lokalizace SpryTD je cílená přímou vazbou na fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu v plazmatické membráně. Bylo prokázáno, že tato interakce je nezbytná pro normální funkci *hSpry2* jako inhibitoru Ras/MAPK signalizace a membránová lokalizace či translokace se tedy jeví jako nezbytná pro inhibiční efekt Sprouty proteinů (Lim *et al.*, 2002). Závěrem porovnání sekvencí proteinů je, že Sprouty fungují podobným mechanismem u vzdáleně příbuzných organismů, a především je podtrhována důležitost SpryTD a domény na N-konci proteinu s krátkým tyrosinovým motivem, který je konzervován u *Drosophily* i savců (Guy *et al.*, 2003).

Sprouty proteiny hrají významnou roli při vzniku tělesných tkání během organogeneze. Studií zaměřenou na organogenezi u myši bylo vyvozeno, že *Sprouty1*, *Sprouty2* a *Sprouty4* jsou exprimovány v hojném počtu vyvíjejících se orgánů (mozek, zuby, slinné žlázy, plíce, končetinové pupeny a další) a řídí nebo se podílejí na řízení epiteliálně-mezenchymových interakcí v rámci vývojových procesů. V myším embryonálním stádiu 14,5 byla zachycena exprese *Sprouty1*, *Sprouty2* a *Sprouty4* v epitelu a perichondriu v oblasti vyvíjejících se prstů (Zhang *et al.*, 2001).

Vzhledem k myším kmenům použitým v této práci, se v následujících dvou podkapitolách budu blíže zabývat proteiny *Sprouty2* a *Sprouty4*.

4.4.1 *Sprouty2*

Sprouty2 gen kóduje protein patřící do Sprouty rodiny. Myší *Sprouty2* (*mSprouty2*) se nachází na chromozomu 14, lidský ortholog (*hSprouty2*) je na 13. chromozomu (Leeksmá *et al.*, 2002). Z rodiny Sprouty proteinů vykazuje právě *Sprouty2* nejvyšší podobnost s *dSprouty* (de Maximy *et al.*, 1999). Výsledky porovnání myšího, lidského a kuřecího *Sprouty2* genu vykazovaly vysokou míru podobnosti sekvencí (např. *mSprouty2* a *hSprouty2*, 97% shoda sekvencí aminokyselin). Na základě tohoto zjištění je možné tvrdit, že v rámci evolučního vývoje zůstal tento gen velmi konzervovaný, a také, že největší rozdíly mezi druhy jsou v N-terminální doméně proteinu (Minowada *et al.*, 1999).

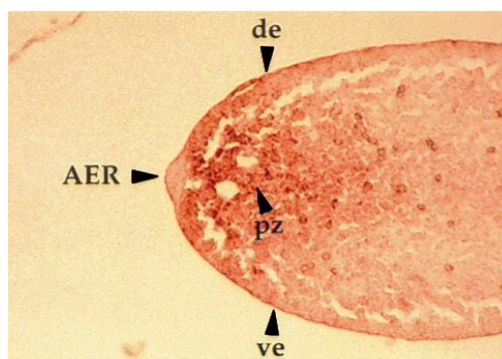
Obecně lze říci, že transkripty tohoto genu jsou přítomné v oblastech s objasněným působením FGF. *Sprouty2* byl detekován v mezenchymu končetinových pupenů, ale nebyl přítomen v AER a ektodermu, což naznačuje, že ne vždy je *Sprouty2* exprimován ve všech tkáních s aktivovanými FGFR (Chambers & Mason, 2000). Prokázalo se, že protein *Sprouty2* hraje důležitou roli v nespočetném množství vývojových procesů, mezi něž se řadí i vývoj končetin (Minowada *et al.*, 1999). *Sprouty2* je podstatný jako regulátor enchondrální osifikace, také moduluje signalizaci v osteoblastech a chondrocytech a je důležitý pro normální proliferaci a diferenciaci chondrocytů (Joo *et al.*, 2016).

Proliferace a diferenciaci osteoblastů je indukována FGF a BMP prostřednictvím extracelulární signálně-regulovanou kinázou 1/2 (ERK1/2) a Smad drahami (Miraoui & Marie, 2010). Právě prostřednictvím těchto drah se *Sprouty2* podílí na formování kosti. Exprese *Sprouty2* je v osteoblastech indukována FGF stimulací a jeho nadměrná exprese potlačuje proliferaci a diferenciaci osteoblastů. Navíc se *Sprouty2* gen projevil jako inhibitor mineralizace matrix. Tato zjištění vedla k závěru, že *Sprouty2* má významnou funkci ve vývoji osteoblastů, a to cestou down-regulace dráhy FGF-ERK1/2 a BMP (Taketomi *et al.*, 2018).

4.4.2 *Sprouty4*

V rámci genomu je lidský *Sprouty4* (*hSprouty4*) lokalizován na 5. chromozomu, u myši se nachází v centrální oblasti chromozomu 18 (Minowada *et al.*, 1999). Tento gen kóduje protein o velikosti 322 aminokyselin. Na úrovni DNA vykazuje myši a lidský *Sprouty4* gen homologii 87 % a na proteinové úrovni 88 %. Toto zjištění indikuje, že i *Sprouty4* gen zůstal během evoluce obratlovců vysoce konzervovaný (Leeksma *et al.*, 2002).

Na myším modelu bylo zjištěno, že *Sprouty4* se exprimuje v růstové zóně, tedy ve vrstvě mezodermových buněk nacházejících se pod AER během vývoje končetinového pupene, a v ektodermu končetiny. Naopak tento gen není exprimován přímo v apikální ektodermové liště (obr. 8) (de Maximy *et al.*, 1999).



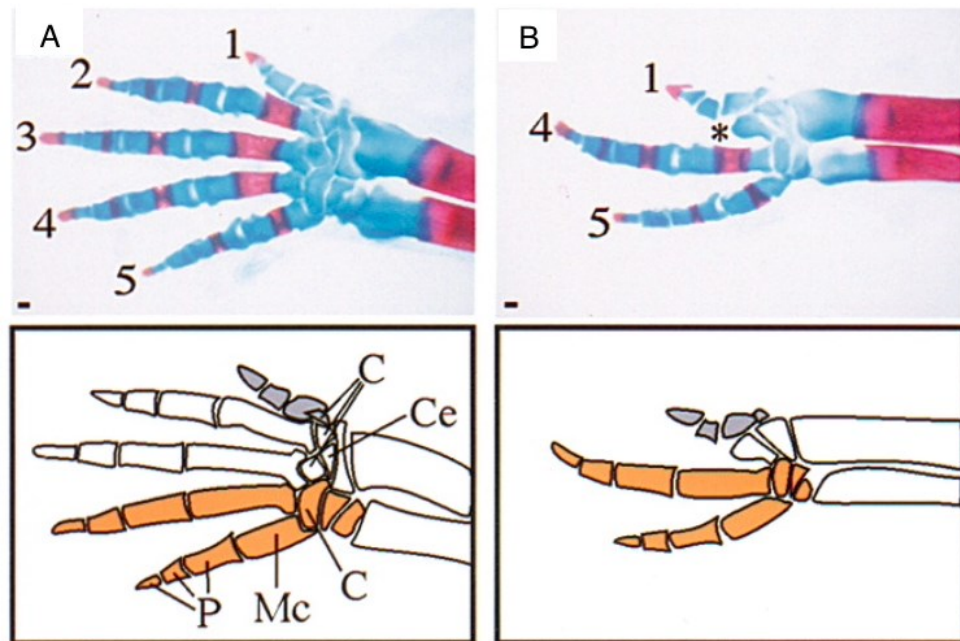
Obrázek 8 Znárodnění exprese *Sprouty4* na podélném řezu končetinovým pupenem myšního embrya (11,5 ED). AER – apikální ektodermová lišta; de – dorzální ektoderm; pz – růstová zóna; ve – ventrální ektoderm (převzato z de Maximy *et al.*, 1999).

V rámci studie zabývající se významem *Sprouty2* a *Sprouty4* v embryonální morfogenezi bylo zjištěno, že v obou případech genů byly double knockout (KO) myši letální již prenatálně a vykazovaly závažné patologie, a to zejména v kraniofaciální oblasti, dále v morfogenezi plic a končetin. *Sprouty4* deficientní myši vykazovaly polysyndaktylii a v rámci fenotypového projevu byly charakteristické fúze a duplikace prstů na předních končetinách (Taniguchi *et al.*, 2007). Tato studie potvrdila výsledky předchozího bádání zaměřeného na rozsáhlý screening patogenezí spojených se *Sprouty4* genem, jakožto regulátorem normálního vývoje končetin (Hansen *et al.*, 2003).

4.5 Sonic Hedgehog ve vztahu k vývoji končetin

Sonic Hedgehog jsou členové rodiny signálních proteinů Hedgehog (Hh), které hrají zásadní role během embryonálního vývoje tkání obratlovců, včetně mozku a míchy, axiální kostry a končetin. Na zadním okraji končetinového pupene obratlovců se nachází skupina mezenchymových buněk, jež se nazývá jako zóna polarizační aktivity. V této oblasti se exprimuje gen kódující protein Shh, který funguje jako morfogen ZPA a specifikuje polohové údaje anteroposteriorní osy končetiny, na autopodiu tedy od palce k malíčku (Masuya *et al.*, 1995, Riddle *et al.*, 1993).

Bylo prokázáno, že *Shh* stimuluje proliferaci mezenchymových buněk a reguluje anteroposteriorní délku AER, a tím řídí šířku končetinového pupene (Smith & Wolpert, 1981). Exprese *Shh* je přímo vyvolána faktorem *Hand2*, jehož úroveň aktivity je vyvolána na základě reciproční aktivity dvou regulátorů exprese *Shh*, a to negativním regulátorem *Gli3* a pozitivním *Hand2* (Matsubara *et al.*, 2017). *Shh* působí prostřednictvím transkripčního faktoru *Gli3*, čímž dochází k regulaci morfologie autopodia skrze kontrolu počtu prstů a jejich identitu (Litingtung *et al.*, 2002). Tvorba 1. prstu je na *Shh* nezávislá, jelikož bylo prokázáno, že se tvoří i u *Shh*^{-/-} mutantů, 4. a 5. prst se vytváří, jelikož jejich tvorba vychází přímo z oblasti exprese *Shh*, avšak *Shh* forma modifikovaná cholesterolem je nepostradatelná pro signalizaci na dlouhé vzdálenosti a tvorbu 2. a 3. prstu (obr. 9) (Lewis *et al.*, 2001). Změna signalizace *Shh* se podílí na vrozených vadách končetin a na vývoji morfologické diverzity končetin obratlovců.



Obrázek 9 Levá přední končetina myši v embryonálním stádiu 18,5; zobrazení kostní a chrupavčité tkáně (A, B) a schématických nákresů pro přehlednost jednotlivých kostí. Končetina myši s normální expresí *Shh* (A) a končetina myši, jež měla jednu alelu tzv. N-*Shh* (B), která vytváří zkrácený protein *Shh* bez modifikace cholesterolem. U této končetiny došlo k vytvoření pouze 1., 4. a 5. prstu, zatímco došlo ke ztrátě 2. a 3. prstu. V oblasti mezi 1. a 4. prstem se nachází metakarpální rudiment (označeno hvězdičkou). Barveno alizarinovou červení (kostní tkáň) a alciánovou modří (chrupavčitá tkáň). C – karpální kosti, Ce – centrální elementy, Mc – metakarpální kosti, P – články prstů. Měřítko určuje 100 μm (upraveno podle Lewis *et al.*, 2001).

Je dobře známo, že Hh signální dráha je jedna z nejméně ovlivněných dysfunkcí primárních cilií. Odstranění primárních cilií blokuje odpověď Shh a Ihh (Indian Hedgehog), což vede k rozmanitým defektům zahrnující i zkrácení kostí končetin (Bangs & Anderson, 2017).

V distálním vrcholu cilií jsou lokalizovány hlavní regulátory Hh signalizace, a to proteiny Gli1, 2, 3 a negativní regulátor dráhy vázající Gli proteiny – Sufu (*Suppressor of fused*) (Haycraft *et al.*, 2005). *Shh* signalizace v ZPA naopak inhibuje nepřetržité zpracování Gli3, což vede k vytvoření gradientu represoru Gli3 (Gli3R) v končetinovém pupenu. Anteriorně je jeho hladina vysoká a posteriorním směrem se snižuje. Za přítomnosti Shh je inhibováno štěpení aktivátoru Gli3 (Gli3A) na Gli3R (Wang *et al.*, 2000; Zeller, 2004). Bylo prokázáno, že proteiny Sprouty2 a Sprouty4 se podílí na regulaci Hh signalizace, která je spojována se změnami délky primárních cilií (Hrubá *et al.*, 2021).

5 Malformace horních končetin u člověka

Jako příklad frekvence těchto vad v populaci lze uvést populační studie z Austrálie a Švédska, které uvádí, že se incidence malformací horních končetin v populaci pohybuje kolem 20 dětí na 10 000 živě narozených (Giele *et al.*, 2001; Ekblom *et al.*, 2010). Nejčastěji byly ve studiích zaznamenány oboustranné vady, následovaly levostranné odchylky a méně časté pravostranné (Ekblom *et al.*, 2010). Nejčastější vady ruky jsou syndaktylie a polydaktylie, u kterých je běžně možný chirurgický zákrok k nápravě vady (Chong, 2010).

Klasifikace vrozených vad horních končetin není sjednocená a využívá se různých klasifikačních kritérií. Mezi používané patří např. IFSSH systém, vytvořený dle Mezinárodní federace společností pro chirurgii ruky (*International Federation of Societies for Surgery of the Hand*), který člení vrozené anomálie ruky do sedmi základních skupin – I: chybné založení částí končetin, porucha formace II: chyby v diferenciaci částí končetin, III: duplikace, IV: nadměrný vývoj, V: nedostatečný vývoj, VI: amniotické konstrikce a VII: vrozené defekty končetin spojené s dalšími anomáliemi (Swanson, 1976). Na základě nových poznatků o vývoji končetin z pohledu molekulární biologie je snaha tento systém modifikovat (Manske & Oberg, 2009).

5.1 Achondroplazie

Achondroplazie je nejčastější genetická forma lidského dwarfismu, neboli disproporcionálního trpaslictví s krátkými končetinami. Již při narození je patrný klinický

obraz onemocnění. Hlava je typicky rozšířená a zvětšená. Na obličejové části je pozorováno prominující čelo i mandibula, a dále oploštěný rozšířený kořen nosu. Při narození je také patrný nepoměr délky mezi hrudníkem a dolními končetinami. Horní i dolní končetiny jsou zkráceny, přičemž nejvíce zasažené jsou proximální segmenty končetin, čímž dochází k nepoměru mezi předloktím a paží, případně mezi bérceem a stehnem. Ruce jsou široké s krátkými prsty, nejvýrazněji bývá zkrácen 3. prst (Dungl, 2014).

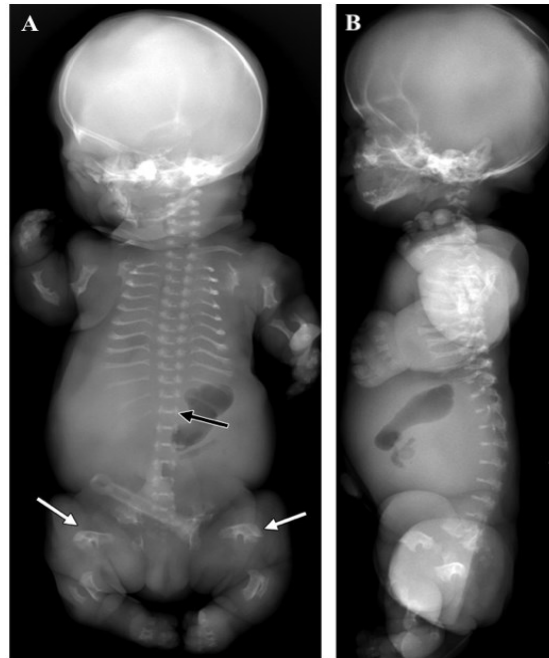
Achondroplazie je onemocněním autozomálně dominantní, avšak velké množství případů vzniká sporadicky. Gen onemocnění byl objeven na krátkém raménku 4. chromozomu (Francomano *et al.*, 1994). V tomtéž regionu 4. chromozomu byl taktéž nalezen gen pro FGFR3, jehož mutace transmembránové domény vedou k tomuto onemocnění (Thompson *et al.*, 1991; Shiang *et al.*, 1994). Většina případů achondroplazie je způsobená jednou ze dvou mutací nukleotidu 1138 (G1138A a G1138C) v 10. exonu genu pro FGFR3, které ústí ve specifickou substituci aminokyselin. Konkrétně se jedná o substituci glycinu za arginin (G380A) a jedná se o nejvíce mutující nukleotidový pár v lidském genomu (Rousseau *et al.*, 1994; Bellus *et al.*, 1995). Sporadické případy achondroplazií jsou spojovány s pokročilým věkem otce. Faktory ovlivňující replikaci a opravy DNA během spermatogeneze mohou predisponovat k výskytu mutací FGFR3 (Wilkin *et al.*, 1998).

U achondroplazie je různými způsoby narušena enchondrální osifikace kostí. Dochází k výraznému zúžení zón proliferující a hypertrofické chrupavky, jejíž sloupce jsou nepravidelné, krátké a obsahují vyšší počet degenerujících chondrocytů. Kvalitativními změnami dochází k přerušení růstové ploténky, a to různými způsoby. Jedná se např. o přerušení způsobené oblastí shluklých buněk se skupinami vakuolizovaných, velkých a nepravidelně uspořádaných chondrocytů, dále místy s lokální vakuolizací mezibuněčné matrix, případně se mohou vyskytnout i vazivové pruhy s předčasnou kalcifikací a membranózní osifikací (Briner *et al.*, 1991).

5.2 Thanatoforická dysplazie

Thanatoforická dysplazie je závažná forma trpaslictví, která je i přes nízkou incidenci, pohybující se v rozmezí 1:20 000-50 0000 novorozenců, nejčastější letální formou dwarfismu (Orioli *et al.*, 1986). Toto onemocnění je charakteristické významně zkrácenými a deformovanými končetinami, zúženým hrudníkem, normální délkou trupu, nedovyvinutými plícemi, makrocefálií a malým *foramen magnum*. Na základě klinických

příznaků je thanatoforická dysplazie rozdělena do dvou skupin. Thanatoforická dysplazie typu 1, častější typ onemocnění, je charakterizována krátkými končetinami, úzkým hrudním košem a zakřivenou stehenní kostí (obr. 10), zatímco u typu 2 se vyskytují krátké končetiny, úzký hrudní koš, rovné stehenní kosti a lebka ve tvaru jetelovitého listu (Chen *et al.*, 2001).



Obrázek 10 Rentgenové snímky mrtvě narozeného доноšeného chlapce s thanatoforickou dysplazií typu 1. Na frontálním (A) a laterálním (B) snímku je výrazné zkrácení horních i dolních končetin, zkrácená žebra, zakřivené krátké stehenní kosti (bílé šipky) a zploštělá těla obratlů (černá šipka), jež jsou také jedním z příznaků tohoto onemocnění (převzato ze Sargar *et al.*, 2017).

K úmrtí novorozence může dojít ještě před narozením, případně k němu dochází brzy po narození z příčin respiračního selhání. Existuje pouze malé množství případů delšího přežití pacienta s touto diagnózou (Baker *et al.*, 1997). Na základě jednoho z případů dlouhodobě přeživšího devítiletého chlapce dochází však také k úvahám, zda označení „letální“ je správné. Rodinám, které se setkají u svých potomků s touto diagnózou, je doporučováno zvážit ukončení těhotenství, anebo neonatální paliativní péči po porodu, přestože nyní může být prognóza thanatoforické dysplazie považována za nejistou (Carroll *et al.*, 2020).

Thanatoforická dysplazie je členem achondroplastické rodiny lidských kosterních dysplazií, které jsou autozomálně dominantní, a jež jsou výsledkem mutací genu kódujícího FGFR3. Mutace zapříčiňují konstitutivní aktivaci FGFR3, a tím je zvýšen inhibiční vliv tohoto receptoru na proliferaci a diferenciaci chondrocytů v růstové ploténce (Wilcox *et al.*,

1998). Nejvíce případů thanatoforické dysplazie typu 1 je způsobeno pěti různými mutacemi, jež způsobují substituci několika aminokyselin v extracelulárních i intracelulárních doménách proteinu FGFR3 (Passos-Bueno *et al.*, 1999). Nicméně byly popsány i mutace ve stop kodónu, jež způsobují elongaci FGFR3 proteinu na jeho C-konci (Rousseau *et al.*, 1995). Druhý typ thanatoforické dysplazie je způsoben jedno bodovými mutacemi v genu FGFR3 (Naski *et al.*, 1996).

Receptory FGFR3 nesoucí mutace spojené s achondroplazií a thanatoforickou dysplazií typu 2 se obměňují pomaleji než normálně. Toto zpoždění je dáno poruchou ubikvitinace aktivovaného FGFR3 zprostředkované c-Cbl, a tímto může přispět k zisku funkce receptoru spojené s těmito poruchami (Cho *et al.*, 2004). Signály FGFR3 indukují a aktivují *Spry2*, který může modulovat signalizaci FGFR3 prostřednictvím svého účinku na ubikvitinaci zprostředkovanou c-Cbl, což by mohlo zpomalit obměnu receptoru. U myši i lidí postižených thanatoforickou dysplazií typu 2 byla v chondrocytech růstových plotének zaznamenána vyšší hladina *Spry2* ve srovnání s kontrolními subjekty (Guo *et al.*, 2008).

5.3 Hypochondroplazie

Hypochondroplazie je skeletální dysplazie charakteristická malým vzrůstem, podsaditou postavou, disproporcionálně zkrácenými končetinami, typické jsou široké krátké ruce a nohy a makrocefalie. Klinické projevy, radiologické příznaky a histopatologické aspekty chrupavky růstové ploténky bývají velmi podobné změnám u achondroplazie, ale bývají méně závažné (Wynne-Davies *et al.*, 1981). Porodní hmotnost a délka jsou často v normálním rozmezí a nepoměr v délce končetiny k trupu je často mírný a v kojeneckém věku snadno přehlédnutelný.

Hypochondroplazie je dědičná autozomálně dominantně, rodiče postižených jedinců bývají spíše průměrného vzrůstu a u většiny postižených je toto onemocnění výsledkem de novo mutace. Gen onemocnění se nachází na krátkém raménku 4. chromozomu, tedy též v oblasti genu FGFR3 (Merrer *et al.*, 1994). Bylo objasněno, že právě mutace v genu pro FGFR3 je základem pro rozvinutí hypochondroplazie, kdy u převážného množství případů dochází k typické substituci asparaginu za lysin (N540K) (Prinos *et al.*, 1995).

5.4 Rozštěp ruky

Rozštěp ruky, též nazývaný jako ektrodaktylie či klepetovitá ruka, je vrozená anomálie ruky a tvoří významnou skupinu vrozených vývojových vad. Tato vada je

definována jako centrální podélný deficit, který se projevuje potlačením kostí a/nebo přidružených měkkých tkání v centrální oblasti ruky, zahrnující ukazováček, prostředníček a prsteníček (Nutt *et al.*, 1981; Manske & Oberg, 2009). Rozštěp ruky se může objevovat jako izolovaná vada nebo jako součást syndromu, např. Polandova syndromu (Al-Qattan, 2001) a ektrodaktylní-ektodermální dysplázie-rozštěpového (EEC) syndromu (Celli *et al.*, 1999).

Rozštěp ruky může být členěn na typický a atypický. Typický rozštěp má tvar písmene V, úplně nebo částečně chybí třetí prst a obvykle je postižení bilaterální, kdežto u atypického rozštěpu ruky je vada formována do písmene U a obvykle se projevuje pouze na jedné ruce. Atypický rozštěp je také znám pod názvem symbrachydaktýlie (Ogino *et al.*, 1989). Rozdílný je také samotný vznik těchto rozštěpů. Typický rozštěp vzniká neobvyklým dělením mezenchymální tkáně v důsledku abnormálního vývoje AER, kdežto atypická forma rozštěpu je způsobena nekrózou mezenchymální tkáně a snahou těla regenerovat nedostatečnou strukturu (Miura, 1978; Miura & Suzuki, 1984).

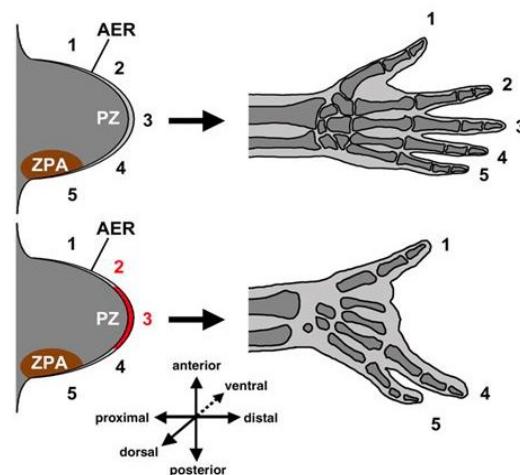
Běžně uváděná incidence typické formy rozštěpu ruky je 1:90 000 porodů a 1:120 000 v populaci, atypický rozštěp se vyskytuje u 1:150 000 porodů, v populaci je incidence 1:200 000 (Dy *et al.*, 2014). Toto onemocnění postihuje více muže než ženy (Tatwade & Hiwarkar, 2019).

Izolovaný rozštěp ruky je vada, která je ve většině případů děděna autozomálně dominantně se sníženou penetrancí, přičemž může docházet k defektům v různých genech. Pomocí genetických map byly určeny lokusy pro rozštěpová onemocnění ruky/nohy (SHFM – *Split-hand/split-foot malformation*) –7q21 (označen jako SHFM1; obr. 11a) (Scherer *et al.*, 1994), 10q24 (SHFM3; obr. 11b) (Nunes *et al.*, 1995), 3q27 (SHFM4) (Ianakiev *et al.*, 2000), 2q31 (SHFM5) (Boles *et al.*, 1995) a 12q13 (SHFM6) (Ugur & Tolun; 2008). Taktéž byl zaznamenán jeden případ X vázané dědičnosti (Ahmad *et al.*, 1987) a později byl detekován přesný lokus výskytu mutace Xq26 (SHFM2) (Faiyaz ul Haque *et al.*, 1993). Zřídka kdy může být tato malformace děděna také autosomálně recesivně (Gül & Öktenli, 2002). V ojedinělých případech bez rodinné historie může dojít i k de novo delecím či duplikacím (Roberts *et al.*, 1991; Kano *et al.*, 2005).

Hlavním mechanismem patogeneze rozštěpu autopodia je selhání signalizace v AER, a to v její mediální části (obr. 12) (Lo Iacono *et al.*, 2008). Narušení funkce AER může být způsobeno prostřednictvím zvýšené buněčné smrti nebo sníženou buněčnou proliferací. Centrální přerušení AER bylo prokázáno na zvířecím modelu, u něhož byla



Obrázek 11 Snímky pacientů s SHFM, jež mají rozdílné molekulární počátky defektu ruky. **a)** Pacient s klasickým rozštěpem ruky s vyváženou chromozomovou translokací v lokusu SHFM1. **b)** Pacientka s typickou 10q24 duplikací lokusu SHFM3 vykazující ektrodaktylii a preaxiální polydaktylii rukou (upraveno podle Sowińska-Seidler *et al.*, 2014).



Obrázek 12 Vznik základního defektu AER. Normální vývoj autopodia (nahore) a rozštěp ruky (dole). Ektrodaktylie je způsobena selháním udržení aktivity v mediální části AER (červeně) na vyvíjejícím se končetinovém pupenu. Toto selhání způsobuje absenci centrálních paprsků prstů. Čísly 1-5 je označena budoucí pozice jednotlivých prstů. AER – apikální ektodermová lišta; PZ – růstová zóna; ZPA – zóna polarizační aktivity (převzato z Duijf *et al.*, 2003).

zaznamenána rozšířená buněčná smrt v ektodermu a mezodermu končetinových pupenů se sníženou expresí rozličných faktorů, které se podílejí na organizování končetiny spolu s apoptickými faktory (Naruse *et al.*, 2007). Jedná se o vadu AER, která nevzniká v raných stádiích vývoje končetin, jelikož by v opačném případě docházelo k závažnějším malformacím končetin, nejen autopodia (Duijf *et al.*, 2003).

Na funkčnost takto postižené ruky může mít vada pouze mírný vliv, nicméně z kosmetického hlediska může být vliv významný na psychickou stránku postiženého (Buss, 1994). Náprava vady se provádí chirurgicky s cílem dosáhnout nejen lepších uchopovacích schopností, ale především uspokojujícího vzhledu. Chirurgický zákrok zahrnuje uzávěr rozštěpu, uvolnění syndaktylie, korekci addukce palce a odstranění příčných nebo deformujících kostí. Komplikovanější zákrok je nutné vykonat v případě atypického rozštěpu kvůli nedovyvinutému palci či malíčku (Baba *et al.*, 2009).

5.5 Syndaktylie a synostózy

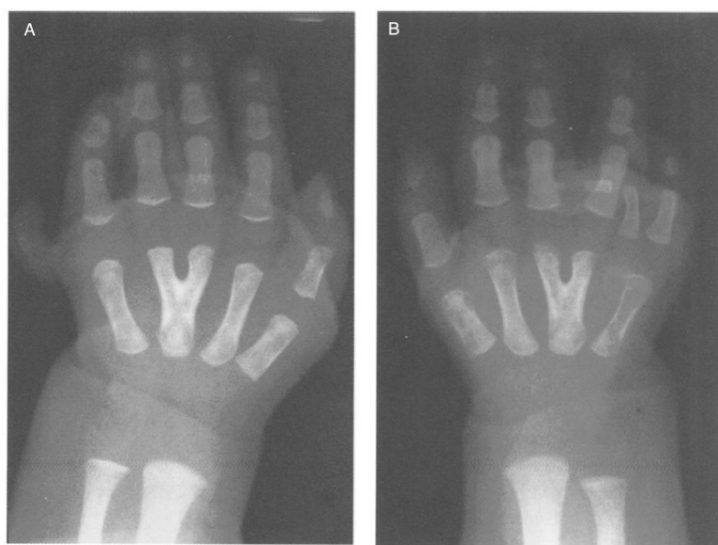
Mezi 7. a 8. týdnem embryonálního vývoje může docházet ke vzniku vad, které jsou výsledkem poruchy apoptózy. Jedná se zejména o synostózy různých částí končetin a syndaktylie. Syndaktylie je nejčastější vrozenou vadou končetin s výskytem 1:2 000 a může být v kombinaci s dalšími vadami nebo systémovými vadami (např. Polandův syndrom, Apertův syndrom, polydaktylie).

Syndaktylie se dle délky spojení může rozdělovat na kompletní, u které dochází ke spojení prstů v celé své délce a částečnou (nekompletní), kdy jsou spojeny pouze části prstů. Nejčastěji dochází ke spojení proximálních částí prstů, vzácně může docházet ke spojení v distální oblasti, a naopak nespojení proximální oblasti. Tím vzniká tzv. fenestrovaná syndaktylie (Dungl, 2014).

Fúze prstů (kostní syndaktylie) a nadpočetné prsty na rukách a/nebo na nohách (polydaktylie) jsou velmi časté abnormality u pacientů s Pallister-Hallovým syndromem (obr.13). Dále jsou pro tento syndrom charakteristické malformace hlavy, včetně obličejové části, anomálie mozku či neprůchozí konečník (Unsinn *et al.*, 1995).

Pallister-Hallův syndrom je autosomálně dominantní onemocnění, které je způsobeno mutacemi v genu *Gli3*. Protein Gli3 patří do rodiny transkripčních faktorů Gli, které negativně regulují extracelulární signály Shh. Ty jsou považovány za primární determinanty antero-posteriorního vývoje končetin u obratlovců, jež Gli3 reguluje omezením jejich exprese a vlivu na posteriorní mesoderm (Ingham & McMahon, 2001; Büscher *et al.*, 1997).

Pokud chybí *Shh* signály, Gli3 se přeměňuje na kratší izoformu, a to na transkripční represor označovaný jako Gli3R. Regulace zpracování Gli3 pomocí Shh je nezbytné pro určení správné identity a počtu prstů během časného embryonálního vývoje (Litingtung *et al.*, 2002). Vysoké hladiny Gli3R narušují udržování zpětné vazby Shh/FGF, která je nezbytná pro správný růst končetinového pupene (Hill *et al.*, 2007).



Obrázek 13 **Rentgenové snímky levé (A) a pravé (B) ruky pacienta s Pallister-Hallovým syndromem.** Na levé i pravé ruce jsou vyvinuty pouze čtyři metakarpální kosti, přičemž třetí metakarpální kost je částečně duplikovaná a vytváří tak abnormální tvar kosti ve tvaru písmene Y. Každý konec této abnormální metakarpální kosti je asociován s kompletním prstem. Na ulnární straně levé ruky je také viditelný zakrnělý šestý prst. Na pravé ruce je čtvrtá metakarpální kost dysplastická, a také kompletně duplikovaný článek prstu čtvrtého paprsku (převzato z Unsinn *et al.*, 1995).

6 Primární cilie a jejich funkce ve vývoji skeletu

Eukaryotické cilie neboli řasinky jsou vysoce konzervované mikrotubulární orgány, které vyčnívají z povrchu mnoha typů buněk. Můžeme je rozdělit do dvou základních typů – motilní a nemotilní (primární) cilie. Primární cilie jsou nepostradatelnou součástí mnoha procesů – např. se podílejí na vývoji a funkci tkání a orgánů, včetně kostí, a diferenciaci buněčných typů. Během vývoje embrya se uplatňují na vzniku jeho levo-pravé laterality, reprodukčních funkcí, neuronálním vývoji, fotorecepci a dalších orgánových soustav.

Struktura a funkce primárních cilií je závislá na tzv. intraflagelárním transportu (IFT – *intraflagellar transport*) (Kozminski *et al.*, 1993). Jelikož v ciliích nedochází k proteosyntéze, je nutné, aby byly potřebné proteiny pro výstavbu jejich struktury transportovány pomocí mikrotubulů. Transport částic probíhá v obou směrech, tedy jak z těla buňky vně do vrcholu řasinek (IFT komplex B; IFT-B), tak z řasinek zpět do buňky (IFT komplex A; IFT-A) (Rosenbaum & Witman, 2002). Transportní komplexy jsou složeny z různých komponent, a pokud dojde k poruše v některé z podjednotek, dochází k selhání tvorby a udržování řasinek, případně k jejich úplné ztrátě.

Bylo dokázáno, že primární cilie zprostředkovávají aktivitu mnoha vývojových signálních drah, např. Hh signální dráhy (Huangfu *et al.*, 2003) a dráhy FGF (Neugebauer, *et al.*, 2009). Proteiny IFT dokážou modifikovat Gli proteiny, což jim umožňuje získat plnou transkripční aktivitu. Při absenci funkce IFT postrádají Gli proteiny nejen potřebné modifikace, které jsou klíčové pro jejich aktivační a represorové aktivity, ale také schopnost reagovat na Hh signalizaci (Liu *et al.*, 2005). Signalizace FGF ovlivňuje délku primárních řasinek, rychlost IFT a signalizaci Hh (Kunova Bosakova *et al.*, 2018).

Poruchy funkce či struktury primárních cilií jsou asociovány s nejrůznějšími typy vrozených onemocnění u člověka a nazývají se souhrnně jako ciliopatie. Doposud byly identifikovány mutace ve více než 100 ciliárních genech, které jsou považovány za příčinu onemocnění (Faus-Pérez *et al.*, 2015). Ciliopatie se často projevují společnými fenotypovými projevy. Nejčastěji se jedná o kombinaci defektů v ledvinách, sítnici, kostře a centrálním nervovém systému.

Ačkoli přítomnost primárních cilií v chondrocytech byla odhalena již před téměř půl stoletím, teprve v nedávné době byl za využití myších modelů zjištěn funkční význam IFT a cilií ve vývoji skeletu. Primární cilie lze nalézt mimo jiné také v mezenchymálních kmenových buňkách, osteoblastech a osteocytech (Yuan *et al.*, 2015).

Primární cilie a IFT proteiny hrají zásadní roli v diferenciaci osteoblastů, vývoji kostí a funkci osteocytů. Bylo prokázáno, že primární řasinky regulují osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk, které pocházejí z kostní dřene (Tummala *et al.*, 2010). Osteogeneze je regulována několika ciliárními proteiny, a to především IFT80 a IFT88 či IFT motorovým proteinem (KIF3A) (Yuan & Yang, 2016). Zdá se, že IFT80 má přímý vliv na Hh signalizaci, ve srovnání s ostatním IFT, jelikož u mutantních myši *IFT80* byla zjištěna defektní Hh signalizace a ní vycházející skeletální dysplazie bez zjevné poruchy cilií (Rix *et al.*, 2011). IFT80 protein je exprimován v myších dlouhých kostech, lebce a během diferenciaci osteoblastů. Při delecí *IFT80* v myších mezenchymálních kmenových buňkách došlo ke zkrácení nebo ztrátě cilií, a také k inhibici exprese Gli2, jež je jedním z transkripčních faktorů Hh dráhy. Tyto výsledky tedy naznačují, že IFT80 hraje důležitou roli v osteogenezi prostřednictvím regulace signálních drah Hedgehog/Gli (Yang & Wang, 2012).

IFT proteiny, IFT motorové a ciliární proteiny regulují také diferenciaci chondrocytů a vývoj chrupavky. Myši se specifickou delecí *IFT88* v chondrocytech vykazují postnatální dwarfismus a dochází k předčasnému vyčerpání růstových plotének (Song *et al.*, 2007). Delecí *IFT88* je redukována tvorba cilií v růstové ploténce, čímž je narušena diferenciaci chondrocytů, resorpce a diferenciaci chrupavky (Coveney *et al.*, 2022). Taktéž *IFT80* je vysoce exprimovaný v růstové ploténce a je nezbytný pro diferenciaci chondrocytů, která je regulovaná Hh a Wnt signální dráhou (Wang *et al.*, 2013).

V končetinovém pupenu byla zaznamenána přítomnost řasinek v ektodermálních a mezenchymálních buňkách, což naznačuje, že by mohly plnit funkci pro zachycení a přenos morfogenetických signálů. Tím by potenciálně mohla být vysvětlena častá přítomnost defektů končetin u řady ciliopatií (Haycraft *et al.*, 2005). Narušení řasinek buněk mezenchymu ve vyvíjející se končetině vedlo k rozsáhlé polydaktylii se ztrátou patternu anteroposteriorních prstů a zkrácení proximodistální osy (Haycraft *et al.*, 2007).

Poškození primárních cilií může tedy vyústit v defekty končetin, které mají různé projevy (včetně např. změn počtu prstů). Často jsou tato poškození součástí syndromů, u nichž byla zaznamenána změna kostní morfologie nebo průběh enchondrální osifikace.

6.1 Skeletální ciliopatie

V poměrně nedávné době byla skupina skeletálních dysplazií klasifikována jako ciliopatie. Pacienti s těmito poruchami vykazují zkrácení končetin, krátká žebra, polydaktylii

a v některých případech i defekty dalších orgánových soustav, které zahrnují např. renální vady. U těchto onemocnění byly identifikovány mutace v genech kódující proteiny IFT. Více častěji bývají u skeletálních ciliopatií mutované komponenty komplexu IFT-A, nicméně byly zaznamenány i mutace v IFT-B.

Nejběžněji vyskytující se ciliopatie s dopadem na vývoj kosterní soustavy je Jeuneův syndrom. U pacientů trpících Jeuneovým syndromem, který se projevuje úzkým hrudníkem, krátkými žebry a končetinami, polydaktylií a kraniofaciálními defekty, byly zaznamenány mutace obou komplexů. Může se jednat o mutaci v genu pro IFT80 anterográdního transportu (Beales *et al.*, 2007), dále v genu pro IFT139 (Davis *et al.*, 2011) a IFT144 retrográdního ciliárního transportu, jehož absence byla zároveň zaznamenána u pacientů trpících Sensenbrennerovým syndromem (Bredrup *et al.*, 2011).

Častým fenotypovým projevem lidských ciliopatií je polydaktylie. Zdá se, že polydaktylie zůstává konzistentní u většiny myších modelů, na kterých se studují řasinky, a pravděpodobně může být výsledkem defektního štěpení Gli3. Fenotyp u předních končetin může vzniknout v závislosti na poruše signální smyčky SHH-GREM1-FGF, která řídí růst končetin. U mutantů IFT144 by mohla být tato inhibiční smyčka aktivována předčasně, což by mohlo vést k závažným defektům předních končetin (Ashe *et al.*, 2012).

7 Cíle diplomové práce

Ve své diplomové práci jsem se zabývala narušeným vývojem předních končetin u transgenních myší *Spry2/Spry4*.

Na základě uvedených literárních poznatků byly stanoveny tyto cíle:

1. Provést anatomicko-morfologickou analýzu patologií předních končetin u dospělých myší s deficiencí *Sprouty2* a/nebo *Sprouty4*.
2. Analyzovat longitudinální prenatalní vývoj patologií předních končetin u myší s deficiencí *Sprouty2* a/nebo *Sprouty4* od ED 11,5 do ED 18,5.

8 Materiál

V rámci této diplomové práce sloužila vzhledem k anatomickým a vývojovým podobnostem v oblasti končetin jako modelový organismus zkoumání patologií předních končetin myš domácí (*Mus musculus*).

8.1 Myší kmeny

Mus musculus *Spry2*/ORF-null allele a *Spry4*/ORF-null allele

Zvířata použitá v této studii zahrnovala samice *Spry2*/4, které byly připouštěny k samcům *Spry2*/4 s cílem vygenerovat embryonální a postnatální stádia s genotypy: *Spry2*+/-; *Spry4*-/- (obr. 14) a *Spry2*+/+; *Spry4*-/-, které vykazují patologie předních končetin. Myši pro tuto studii byly získány křížením kmenů *Spry2*/ORF-null allele a *Spry4*/ORF-null allele. Původní chovné páry pocházejí z UCSF (San Francisco, USA) (Klein *et al.*, 2006).



Obrázek 14 Myši *Spry2*/ORF-null allele/ *Spry4*/ORF-null allele použité při studii. Myš s genotypem *Spry2*+/+ *Spry4*+/+ (vlevo) a myš s genotypem *Spry2*+/- *Spry4*-/- (vpravo).

Mus musculus B6.129S4-*Gt(ROSA)26Sor^{tm1LacZ}Sor*/J

Jedná se o kmen, který nese gen pro Beta-galaktosidázu (*LacZ*) vložený do lokusu *Gt(ROSA)26Sor*. Exprese *LacZ* je blokována *loxP* ohraničenou STOP sekvencí. Při křížení

s B6.Cg-*Shh^{tm1}(EGFP/cre)Cjt/J* (viz níže) v tzv. cre-loxP systému dochází u potomstva k vyštěpení STOP kodonu a expresi genu pro Beta galaktozidázu, kterou lze následně detekovat X-galovým barvením (viz kapitola 9.5) za vzniku 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindolu, který je oxidován na modrou nerozpustnou sloučeninu, která je vidět pouhým okem. Modré zabarvení bude tedy v tomto případě patrné v buňkách, které v minulosti exprimovaly *Shh*.

B6.Cg-*Shh^{tm1}(EGFP/cre)Cjt/J*

C57BL/6 je myší kmen nesoucí fúzní produkt zahrnující EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) a Cre rekombinázu z endogenního *Shh* lokusu (B6.Cg-*Shh^{tm1}(EGFP/cre)Cjt/J*). *EGFP* a *Cre* exprese je shodná s expresí endogenního proteinu Shh. Zelená fluorescence je tedy patrná v místech exprese Shh.

Všechny použité myši pro připouštění za účelem experimentálního využití embryí pocházejí z vlastních chovů. Ustájení zvířat a provedení experimentů bylo v souladu s národními i mezinárodními pravidly pro chov a ustájení laboratorních zvířat (zákon č. 246/1992, č. 39/2009 Sb., 359/2012 Sb, 419/2012 Sb., 299/2014 Sb.) a se schváleným projektem pokusů (MSMT-272/2020–3).

9 Metody

9.1 Přípouštění myši a odběr embryí

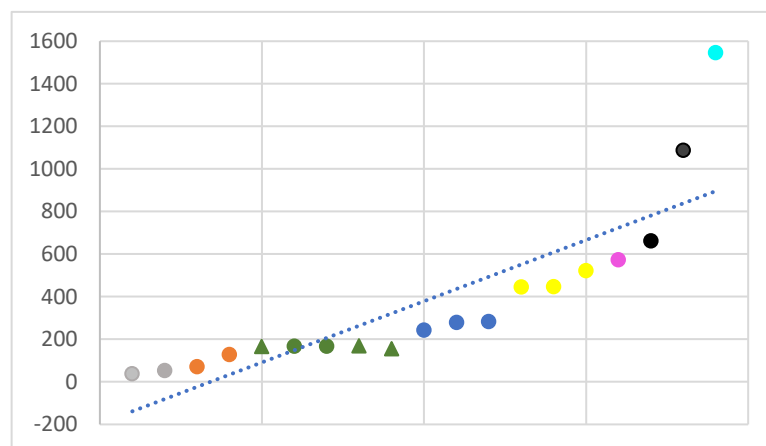
Samice myši požadovaných kmenů byly přes noc připuštěny k samcům s požadovaným genotypem. Jako indikátor oplození slouží vaginální zátka, která je relativně spolehlivým ukazatelem březosti myši. Zjišťování přítomnosti vaginální zátky probíhá ráno po připuštění samice k samci. Půlnoc před odečtením vaginální zátky se označuje jako embryonální den (ED) 0,0.

Břeží samice byly v požadovaném stádiu březosti usmrceny cervikální dislokací a embrya/féty byly odebrány z dělohy na Petriho misku, vyjmuty ze zárodečných obalů a zváženy. Hmotnost embrya je považována za spolehlivý ukazatel stupně vývoje zárodka (Peterka *et al.*, 2002). Pro potřeby této diplomové práce byly zárodky odebírány ve stádiích ED 11,5, 12,5, 13,5, 14,5, 15,5, 16,5, 17,5 a 18,5.

Celkově bylo odebráno 97 embryí *Spry2*; *Spry4* genotypů uvedených v tab. 1. Hmotnosti 19 prenatalních jedinců jsou vyznačeny v grafu 1, ve kterém jsou uvedeni 2 jedinci v ED 11,5 s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, u nichž nelze makroskopicky zaznamenat patologii (viz níže) a 17 jedinců ED 12,5-18,5 vykazující patologie autopodia předních končetin s genotypy *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} a *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-}.

genotyp	embryonální stádium								celkem pro genotyp
	11,5	12,5	13,5	14,5	15,5	16,5	17,5	18,5	
<i>Spry2</i> ^{+/+} <i>Spry4</i> ^{+/+}	0	2	1	6	0	3	1	0	13
<i>Spry2</i> ^{+/+} <i>Spry4</i> ^{+/-}	4	5	4	3	1	4	4	2	27
<i>Spry2</i> ^{+/+} <i>Spry4</i> ^{-/-}	0	2	3 *	0	1	0	0	0	6
<i>Spry2</i> ^{+/-} <i>Spry4</i> ^{+/+}	1	2	6	0	2	1	1	1	14
<i>Spry2</i> ^{+/-} <i>Spry4</i> ^{+/-}	0	2	3	5	2	4	4	1	21
<i>Spry2</i> ^{+/-} <i>Spry4</i> ^{-/-}	2	2 *	2 *	3 *	3 *	1 *	2 *	1 *	16
celkem pro ED	7	15	19	17	9	13	12	5	97

Tabulka 1 Přehled počtů odebraných embryí v jednotlivých ED a pro jednotlivé genotypy. Embrya s genotypem *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{+/+} jsou kontrolní (zeleně), u embryí s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} a *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-} (modře) byly zachyceny patologie předních končetin (hvězdička). Celkem bylo odebráno 97 embryí všech uvedených genotypů v tabulce.



Graf 1 Tělesná hmotnost [mg] použitých embryí s genotypy *Spry2+/- Spry4-/-* (kolečko) a *Spry2+/- Spry4+/-* (trojúhelník) v jednotlivých ED. Dvě embrya ED 11,5 (šedě), 2 embrya ED 12,5 (oranžově), 5 embryí ED 13,5 (zeleně), 3 embrya ED 14,5 (modře), 3 embrya ED 15,5 (žlutě), 1 embryo ED 16,5 (růžově), 2 embrya ED 17,5 (černě) a 1 embryo ED 18,5 (tyrkysově). Celkově 2 embrya ED 11,5, u nichž nelze patologii makroskopicky určit a 17 jedinců s viditelnou patologií (ED 12,5-18,5).

Dále bylo odebráno 25 embryí (tab. 2), která byla použita pro systém Cre-LoxP, s následným dobarvením X-galem k detekci exprese genu *LacZ*.

ED	10,5	11,5	12,5	14,5	15,5
počet	9 (3)	7 (5)	1	6 (3)	2
celkem	25				

Tabulka 2 Přehled počtu odebraných embryí v jednotlivých ED pro systém Cre-LoxP. Celkově bylo odebráno 25 embryí, modře označená hodnota zobrazuje počet embryí, která byla na základě výsledků metody barvení X-galem označena za pozitivní.

9.1.1 Mikropreparace

Embryím odebraným z dělohy samice byly odpreparovány přední končetiny. Část tkání z každého zárodku byla odebrána pro genotypizaci. Vzorky byly po dobu 24 hodin fixovány ve 4% paraformaldehydu (PFA; Sigma), poté uchovávány v 1% PFA při 4 °C a dále zpracovávány.

Odebrané přední končetiny embryí genotypů *Sprouty2+/- Sprouty4-/-*, *Sprouty2+/- Sprouty4+/-* (viz tab. 1) byly před zahájením veškerých dalších postupů vyfotografovány na stereolupě LEICA MZ16 (Pragolab) s kamerou AxioCam 208 color

(Zeiss). Odebrané přední končetiny pro sledování buněčných linií (viz tab. 2) byly zabarveny X-galovým barvením (viz níže) a následně rovněž před histologickou analýzou dokumentovány na stereolupě LEICA MZ16 (Pragolab) s kamerou AxioCam 208 color (Zeiss).

9.2 Odběr postnatálních jedinců

Pro účely studie byly dále využity postnatální myši s požadovaným genotypem (*Sprouty2*^{+/-} *Sprouty4*^{-/-}, *Sprouty2*^{+/+} *Sprouty4*^{-/-}). Zjišťování genotypu probíhalo po samotném odběru (věk 1 týden) či při odstavu jedinců (věk minimálně 21 dnů), kterým byla odebrána tkáň (špička ocasu, resp. prstu zadní končetiny), jež se využila ke genotypování (viz níže).

Požadovaní jedinci s genotypem vhodným pro studii byli usmrceni cervikální dislokací v rozdílném (adultním) věku (6, 7, 8, 10, 13, 14, 16 a 33 týdnů) a byly jim vypreparovány přední končetiny, jež byly dále zbaveny kůže. Přední končetiny byly fixovány ve 4% PFA (24 h), poté byly převedeny do fosfátového pufru (PBS; 1,5 h), 30% etOH (2 h), 50% etOH (2 h) a 70% etOH, ve kterém vzorky zůstaly uloženy při teplotě 4 °C, a poté zpracovány.

Odebrané přední končetiny byly vyfotografovány na LEICA MZ16 (Pragolab) s kamerou AxioCam 208 color (Zeiss), dále byly zhotoveny microCT snímky (μCT; viz kapitola 9.6). Vzorky byly následně po μCT analýze projasněny a barveny alizarinovou červení a alcianovou modří k detekování kostní a chrupavčité tkáně.

Pro postnatální část studie bylo celkově odebráno 17 jedinců, z čehož 14 jedinců mělo genotyp *Sprouty2*^{+/-} *Sprouty4*^{-/-}, 2 jedinci *Sprouty2*^{+/+} *Sprouty4*^{-/-} a 1 jedinec *Sprouty2*^{+/+} *Sprouty4*^{+/-}, který byl použit jako kontrolní (tab. 3).

genotyp	pohlaví	počet	celkem
<i>Spry2</i> ^{+/-} <i>Spry4</i> ^{-/-} s fenotypem	samec	4	6
	samice	2	
<i>Spry2</i> ^{+/-} <i>Spry4</i> ^{-/-} bez fenotypu	samec	4	8
	samice	4	
<i>Spry2</i> ^{+/+} <i>Spry4</i> ^{-/-}	samec	0	2
	samice	2	
<i>Spry2</i> ^{+/+} <i>Spry4</i> ^{+/-}	samec	1	1
celkem			17

Tabulka 3 **Počet odebraných jedinců pro postnatální část studie.** Bylo odebráno 6 jedinců s genotypem *Sprouty2*^{+/-} *Sprouty4*^{-/-} vykazujících patologii autopodia předních končetin, dále 8 jedinců stejného genotypu bez zjevné patologie předních končetin. S genotypem *Sprouty2*^{+/+} *Sprouty4*^{-/-} byly odebrány 2 jedinci, přičemž oba vykazovaly patologii autopodia předních končetin. Dále byl odebrán 1 jedinec s genotypem *Sprouty2*^{+/+} *Sprouty4*^{+/-}, který byl použit jako kontrolní jedinec.

9.3 Genotypování

Pro zjištění genotypů získaných embryí *Spry2/4* byl odebrán ocásek a část těla jako zásobní vzorek pro genotypizaci. Pro genotypizace postnatálních stádií byla použita špička ocásku, resp. prstu zadní končetiny.

Nejdříve byla ze vzorků izolována DNA v Eppendorf Thermomix Comfort. Vyizolovaná DNA byla použita pro PCR reakci (tab. 4). Pro detekci mutantní a wild-type (WT) alely pro geny *Sprouty2* a *Sprouty4* byly použity 3 primery, pro jednotlivé geny (*Sprouty2*, *Sprouty4*) samostatně (tab. 5).

<i>Sprouty2</i>		opakování 35x	<i>Sprouty4</i>		opakování 31x
teplota	čas [min]		teplota	čas [min]	
95 °C	10:00		95 °C	10:00	
94 °C	0:45		94 °C	1:00	
50 °C	0:45		57 °C	0:45	
72 °C	1:00		72 °C	0:45	
72 °C	2:00		72 °C	5:00	
4 °C	ukončení reakce		4 °C	ukončení reakce	

Tabulka 4 Reakce PCR pro *Sprouty2* a *Sprouty4*.

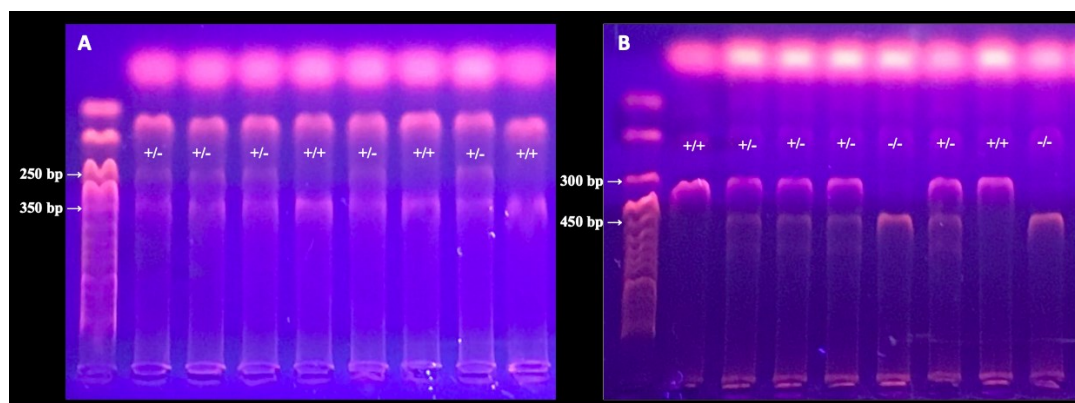
<i>Sprouty2</i>	
Primer A	5'- TTG AGA ACA TGC CTC GAC C - 3'
Primer B	5'- GCA TGG GCT ATT CAC AAA C - 3'
Primer C	5'- GGA TGG CTC TGA TCT GAT CC - 3'

<i>Sprouty4</i>	
Primer A	5'- CAG GAC TTG GGAGTG CTT CCT TAG - 3'
Primer B	5'- CCT CCT AGT ACC TTT TTG GGG AGA G - 3'
Primer C	5'- TAC AGC AGG AAT GGC TAC GGT G - 3'

Tabulka 5 Sekvence použitých primerů pro detekci mutantní a wild-type alely genů *Sprouty2* a *Sprouty4*.

Vizualizace produktů PCR proběhla pomocí gelové elektroforézy. Na gelu byly detekovány mutantní a wild-type fragmenty. *Sprouty2*: wild-type fragmenty – 350 bp, mutantní fragmenty – 250 bp. *Sprouty4*: wild-type fragmenty – 300 bp, mutantní fragmenty – 450 bp.

Na podkladě vygenerovaného výsledného elektroforézového gelu (obr. 15) s mutantními a wild-type (WT) fragmenty byla provedena selekce vzorků získaných jedinců s požadovaným genotypem pro další zpracování.



Obrázek 15 Příklad výsledku elektroforézy genotypizace na *Sprouty2* (A) a *Sprouty4* (B). *Sprouty2*: wild-type fragmenty – 350 bp, mutantní fragmenty – 250 bp. *Sprouty4*: wild-type fragmenty – 300 bp, mutantní fragmenty – 450 bp.

9.4 Histologické zpracování vzorků

Zalévání vzorků do parafinu

Vzorky předních končetin embryí (*Sprouty2*^{+/-} *Sprouty4*^{-/-}) byly fixovány a fotografovány, a poté pro účely histologie a imunohistochemie odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou, přes toluen zality do parafinu dle standardního protokolu rutinně používaného v laboratoři a přes noc ponechány v parafinu ve formičce v termostatu, aby

bylo docíleno uniknutí zbylého vzduchu z parafinu okolo vzorku. Druhý den byly vzorky naorientovány do požadované polohy a ponechány až do zatuhnutí parafinu.

Následně byly jednotlivé vzorky upraveny do parafinových bločků, které byly nakrájeny na mikrotomu LEICA RM2245 na 7 µm histologické řezy a dále zpracovány dle potřeby.

Barvení histologických řezů zeleným (Massonovým) trichromem

Pro detekci kolagenního vaziva na histologických řezech některých embryonálních končetin *Sprouty2+/- Sprouty4-/-* byla použita metoda barvení zeleným trichromem.

Nejprve byla podložní sklíčka s histologickými řezy deparafinována xylenem (2 x 5 min), poté byla provedena rehydratace 96% etOH a následoval proplach pod tekoucí vodou (5 min) a převedení do destilované vody. Nadále byly řezy barveny Weigertovým železitým hematoxylinem (5 min) a promyty pod tekoucí vodou (10 min) a převedeny do destilované vody, po níž následovalo diferencování ponořením v kyselém alkoholu a proplach destilovanou vodou. Poté proběhlo barvení červení (4 min) a proběhl oplach ve vodě (3-4x) a převedení do destilované vody. Po tomto kroku následovalo moření 1% kyselinou fosfowolframovou (1 min) a oplach ve vodě (3-4x) a převedení do destilované vody. Následně byly vzorky převedeny do světlé zeleně (1 min) a opláchnuty ve vodě (3x) a převedeny do destilované vody. Následovalo diferencování v 2% kyselině octové (2 min) a odvodnění v 96% etOH (2 min), 100% etOH (2 min) a projasnění v xylenu (2 x 5 min). Vzorky byly montovány do montovacího činidla DPX a překryty krycím sklem.

Fotografická dokumentace vzorků proběhla na mikroskopu LEICA DMLB s kamerou LEICA MC170 HD.

Barvení histologických řezů jádrovou červení

Pro dobarvování histologických řezů zhotovených pro analýzu X-galem zabarvených končetin (viz kapitola 9.5) byla využita jádrová červeně.

V prvním kroku byla podložní sklíčka s parafinovými řezy odparafinována pomocí xylenu (2 x 10 min), poté byla provedena rehydratace řezů sestupnou alkoholovou řadou. Následně proběhlo barvení jádrovou červení (20 s) a řezy byly promyty d (3 x 2 min) za účelem odstranění přebytečné barvy. Poté byly řezy odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou. Následně byly řezy za pomoci montovacího činidla DPX překryty krycím sklíčkem.

Fotografická dokumentace vzorků proběhla na mikroskopu LEICA DMLB s kamerou LEICA MC170 HD.

Jádrová červeně

Roztok jádrové červeně byl připraven z 5% síranu hlinitého, který byl mírně zahříván. Poté bylo přidáno 0,5 g jádrové červeně (Nuclear fast red, Kernechtrot, Gurr's) a za tepla rozpuštěno. Zchladlý roztok byl přefiltrován.

Projasnění tkáně s následným barvením kostí a chrupavek

Postnatální končetiny myši byly po naskenování μ CT zpracovány metodou projasnění tkáně a barvením kosti alizarinovou červení a chrupavky alcianovou modří.

Z oblasti autopodia byla nejdříve odpreparována kůže a případně potřeby přebytečná svalová tkáň. Poté byla končetina dehydratována a fixována v 96% etOH – nejprve po dobu 6 h, poté přes noc za pokojové teploty. Druhý den byl vzorek převeden do 100% etOH na dobu přibližně 3 dnů a při teplotě 4 °C. Následně byl vzorek inkubován při pokojové teplotě v 0,03% roztoku alcianové modři (Merck) v řádu dnů dle postupu barvení chrupavčité tkáně (2-4 dny). Poté byl vzorek promyt 70% etOH. Promytí bylo aplikováno v několika krocích dle potřeby, dokud ethanol nezůstal čirý. Následně byl vzorek převeden do 96% etOH při pokojové teplotě. Druhý den byl ethanol nahrazen 2% roztokem hydroxidu sodného (KOH) a ponechán přes noc při pokojové teplotě.

Poté byl vzorek převeden do 0,001% roztoku alizarinové červeně (Fluka), ve které byl inkubován v řádu dnů (1-3 dny) za pokojové teploty dle postupu barvení kostní tkáně a projasňování svaloviny. Postup procesu bylo potřebné pečlivě sledovat, aby nedošlo k přebarvení tkáně a disartikulaci končetin. Každý vzorek měl rozdílnou dobu barvení a projasnění tkáně. Následně byly končetiny převedeny do 2% KOH, během projasňování byl roztok denně měněn dokud nebyl čirý a tkáň jasná. Poté byla končetina převedena do roztoku glycerolu a 1% KOH (1:1) k finálnímu projasnění. Pro dlouhodobé skladování byly vzorky uchovány v 100% glycerolu.

Projasněné přední končetiny byly vyfotografovány na LEICA MZ16 (Pragolab) s kamerou Axiocam 208 color (Zeiss).

0,03% alcianová modř

Roztok alcianové modři byl připraven z 0,06 g alcianové modři (Merck), 160 ml 100% etOH a 40 ml ledové kyseliny octové.

0,001% alizarinová červeně

Pro přípravu roztoku alizarinové červeně bylo použito 0,0025 g alizarinové červeně (Fluka) a 250 ml 1% KOH.

9.5 Sledování buněčných linií

Ke sledování populace buněk a jejich potomků, u nichž došlo k transkripci *Shh* od počátku vývoje (tedy v našem případě v ZPA) bylo využito transgenního systému Cre-LoxP (viz výše). Použitý systém Cre-LoxP je založen na následné detekci galaktosidázové aktivity pomocí X-Gal barvení. X-gal je organická sloučenina složená z galaktózy a indolu (5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranosid), která je štěpena galaktosidázou (kódovanou genem *LacZ*). Tím vzniká galaktóza a 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol, jež je oxidován na modrou nerozpustnou sloučeninu, 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo.

Odebraná embrya v požadovaném embryonálním stádiu byla zvážena a umístěna do sodného fosfátového pufru umístěného na ledové tříšti. Následně byla embrya fixována v řádu minut (max. 20 min.) ve 4% PFA při teplotě 4 °C na třepačce, a poté promyta sodným fosfátovým pufrem. Následně probíhalo barvení embryí v barvicím roztoku v temnu přes noc při 37 °C.

Následující den byly pozitivní vzorky promyty v PBS (3 x 10 min) a postfixována ve 4% PFA (24 h). Následující den byla embrya promyta v PBS, a poté z nich byly odpreparovány přední končetiny, které byly zdokumentovány na stereolupě LEICA MZ16 (Pragolab) s kamerou AxioCam 208 color (Zeiss). Tyto vzorky byly následně použity pro histologické zpracování, tedy zality do parafínu (viz výše), sériově nakrájeny na mikrotomu LEICA RM2245 na 7 μ m histologické řezy a dobarveny jádrovou červení.

Sodný fosfátový pufr

Sodný fosfátový pufr (pH 7,5) je složený ze 115 ml roztoku A a 385 ml roztoku B.

A: 6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ v 500 ml destilované vody

B: 13,4 g Na_2HPO_4 v 500 ml destilované vody

Barvicí roztok

100 ml sodného fosfátového pufru

62,5 mg KCl

20,3 mg MgCl₂.6H₂O

126 mg K₄Fe(CN)₆.3H₂O

98,7 mg K₃Fe(CN)₆

Barvicí roztok je nutné držet v temnu při teplotě 4 °C a těsně před použitím je přidáno 240 µl X-gal (50 mg/ml DMF) na 10 ml barvicího roztoku.

9.6 Výpočetní tomografie

Výpočetní tomografie neboli CT (*computed tomography*), je radiologická vyšetřovací metoda založená na průchodu rentgenového záření tkání a umožňuje tak neinvazivní vyšetření různých tělních struktur. Pro zobrazení patologií předních končetin myši byla využita metoda µCT, která je vhodným nástrojem pro získání 3D modelů myšního těla, anebo jeho částí (Ritman, 2004). Toto zobrazení umožňuje velmi podrobný náhled na strukturu s vysokou rozlišovací schopností.

Vzorky byly naskenovány pomocí stolního micro-CT SkyScan 1272 (Bruker microCT, Kontich, Belgie) na kooperujícím pracovišti na 1. LF (na Stomatologické klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice). Projekční obrazy byly rekonstruovány na obrazy příčných řezů pomocí softwaru NRecon (Bruker). 2D vizualizace byly vytvořeny pomocí DataViewer (Bruker).

10 Výsledky

Výsledky studie jsou rozděleny na postnatální a prenatalní část. Nejdříve jsou zařazeny výsledky skupiny postnatálních jedinců, jelikož primárně jsem se zabývala analýzou patologických fenotypových projevů v oblasti autopodia předních končetin u adultních myších jedinců. Tuto část studie doplňují výsledky získané longitudinální analýzou předních končetin prenatalních jedinců, při které jsem se zaměřila na vývoj patologií detekovaných v první části práce.

10.1 Postnatální studie

Pro postnatální studii bylo celkově odebráno 17 postnatálních myší s genotypem *Spry2 +/- Spry4 -/-*, *Spry2+/+ Spry4-/-* a *Spry2+/+ Spry4+/-* (tento jedinec byl použitý jako kontrolní jedinec). Celkově u 8 jedinců byly zachyceny rozličné defekty autopodia předních končetin, z toho 6 jedinců genotypu *Spry2 +/- Spry4 -/-* a 2 jedinci s genotypem *Spry2+/+ Spry4-/-* (viz tab. 3). Patologické změny skeletu u těchto jedinců byly detekovány s různým projevem a závažností.

Celkem 3 postnatální jedinci s genotypem *Spry2 +/- Spry4 -/-* vykazovali bilaterální patologii autopodia (jedinec č. 1, 2 a 3), zbylí jedinci s genotypem *Spry2 +/- Spry4 -/-* (jedinec č. 4, 5 a 6) a 2 jedinci (jedinec č. 7 a 8) s genotypem *Spry2+/+ Spry4-/-* vykazovali unilaterální patologii na levém autopodiu přední končetiny. V tomto pořadí jsou jedinci uvedeni a jejich přední končetiny podrobněji popsány v následující kapitole.

Patologie se projevovaly především v mediální oblasti autopodia. U 4 levých končetin byly zachyceny rozštěpy (ektrodaktylie), které byly ve 2 případech v kombinaci se syndaktylií. Syndaktylie se vyskytovala i jako samostatná vada na 2 končetinách. Zcela nejčastěji zachycenou vadou byly synostózy ve všech částech autopodia – karpální kosti (3 končetiny), metakarpální kosti (5 končetin) a články prstů (6 končetin). Zajímavé byly také časté abnormality sezamský kostí, které buď zcela chyběly, nebo byly fúzované k další kosti. Tato patologie byla zachycena u 7 končetin. Dále byly zachycené také patologie projevující se sníženým počtem prstů (oligodaktylie) celkem u 3 končetin. U 2 končetin bylo zaznamenáno chybné skloubení dlouhých kostí autopodia a s tím související kamptodaktylie.

U 5 jedinců, z čehož u jednoho jedince bilaterálně, byly zachycené další přidružené vady, jako jsou změny velikosti a tvaru prstů, prsty bez přítomnosti drápu a chlupových folikulů a změny ucelenosti povrchu kostí.

Pro hodnocení morfologie a anatomie u patologií skeletu byla použita metoda μ CT v kombinaci s projasněním a barvením chrupavek a kostí (viz výše). Jednotlivé patologie a jejich konkrétní projevy na autopodiu předních končetin postižených jedinců jsou uvedeny v další kapitole.

10.1.1 Patologie autopodia předních končetin jedinců s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}

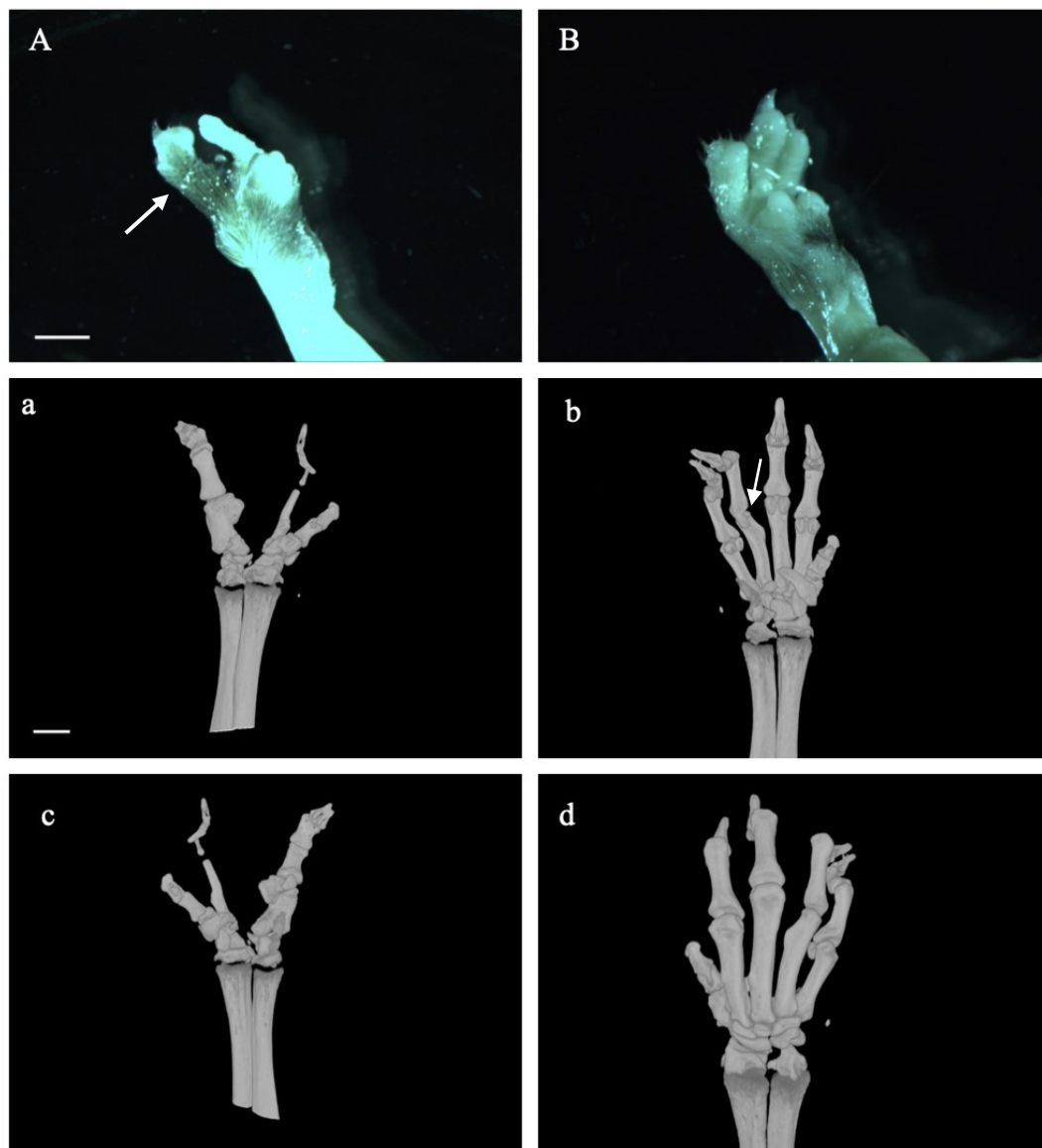
Celkově bylo zachyceno 14 jedinců s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, přičemž 6 z nich vykazovalo zjevné fenotypové odchylky předních končetin (tab. 3) různé závažnosti. V této kapitole bude přehledně popsána každá patologie samostatně, defekty jsou doplněné obrazovou dokumentací.

Jedinec č. 1

Základní informace: pohlaví – samec, věk – 6 týdnů, patologie – bilaterální.

Jedinec č. 1 vykazuje závažné patologie autopodia obou předních končetin. Levá končetina je výrazně deformovaná zapříčiněním mnohonásobných abnormalit. Na první pohled je patrný rozštěp ve střední čáře a syndaktylie (obr. 16A, 18A). Z 3D skenu je patrné, že u této končetiny došlo k rozsáhlému fúzování kostí v různých oblastech autopodia, a to jak v oblasti karpálních, tak i metakarpálních kostí a jednotlivých článků prstů, přičemž nelze jednoznačně rozlišit příslušnost jednotlivých kostí k dané části autopodia ani jejich přesný počet (obr. 16a, c).

Pravá končetina jednoznačně vykazuje kompletní syndaktylii 4. a 5. prstu (obr. 16B). Syndaktylie byla prokázána na skenu skeletu, kde je patrné fúzování mezi distálním článkem 4. a 5. prstu (obr. 16b, d) a potvrzena rovněž i při projasnění a následném zabarvení kostní tkáně alizarinovou červení a chrupavčité tkáně alciánovou modří (obr. 18B). Další patrnou abnormalitou je nejen absence mediální sezamské kosti v oblasti metakarpofalangového



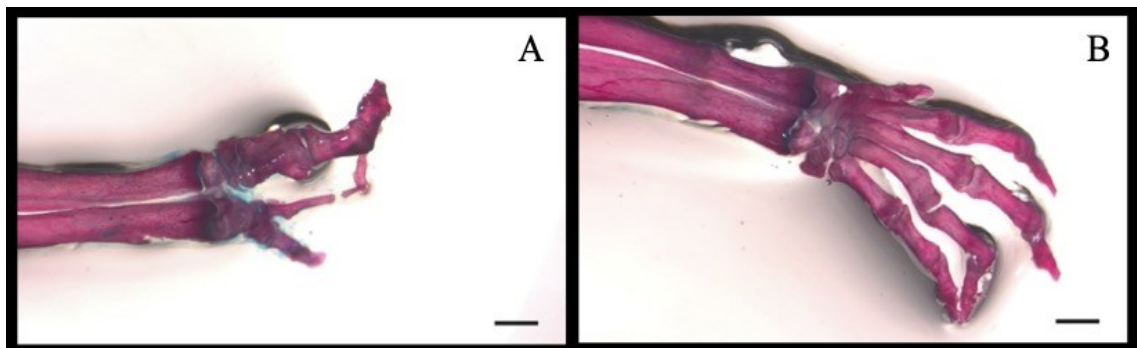
Obrázek 16 **Autopodium levé (A, a, c) a pravé (B, b, d) přední končetiny jedince č. 1.** Vnější vzhled patologie (A, B), 3D skeny skeletu palmárně (a, b) a dorzálně (c, d). Jedinec č. 1 vykazuje závažné patologie obou předních končetin. Na levém autopodiu přední končetiny je zachycen rozštěp ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií (bílá šipka; A). V oblasti karpálních a metakarpálních kostí i článků jednotlivých prstů jsou viditelné četné synostózy (a, c). Autopodium pravé končetiny tohoto jedince vykazuje syndaktylii vzniknuvší fúzováním distálních článků 4. a 5. prstu (B), jež byla prokázána i na 3D skenu skeletu (b, d). Na 4. prstu v oblasti metakarpofalangového kloubu chybí mediální sezamská kost a laterální sezamská kost fúzovala s proximálním článkem tohoto prstu (bílá šipka; b). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

kloubu 4. prstu, ale také synostóza laterální sezamské kosti s proximálním článkem 4. prstu (obr. 16b, obr. 17). Patologie karpálních kostí nejsou u této končetiny přítomny.

Dlouhé kosti levé i pravé končetiny jsou již zcela bez přítomnosti chrupavčité tkáně a patrná je pouze kostní tkáň (obr. 18A, B), nicméně v oblasti karpálních kostí u pravého autopodia jsou viditelné světle modré okraje jednotlivých kostí a patrně je přítomna chrupavčitá tkáň (obr. 18B).



Obrázek 17 **Detail pravé přední končetiny jedince č. 1.** Zobrazeno palmárně. V oblasti metakarpofalangového kloubu 4. prstu je patrná chybějící mediální sezamská kost a zřetelné je fúzování laterální sezamské kosti s proximálním článkem 4. prstu.



Obrázek 18 **Projasněné přední končetiny se zaměřením na levé (A) a pravé (B) autopodium jedince č. 1.** Zobrazeno dorzálně. Dlouhé kosti jsou tvořeny kostní tkání, pozůstatek chrupavčité tkáně je patrný v oblasti karpálních kostí pravé končetiny (B). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

Jedinec č. 2

Základní informace: pohlaví – samec, věk – 6 týdnů, patologie – bilaterální.



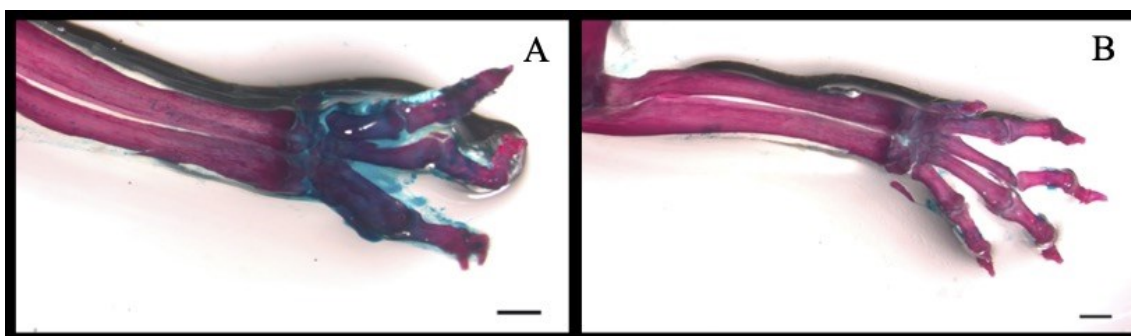
Obrázek 19 Autopodium levé (A, a, c) a pravé (B, b, d) přední končetiny jedince č. 2. Vnější vzhled patologie (A, B), 3D skeny skeletu palmárně (a, b) a dorzálně (c, d). Jedinec č. 2 vykazuje patologie obou předních končetin. Autopodium levé přední končetiny je zasaženo rozštěpem ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií (A). Došlo k fúzi radiálních karpálních kostí s metakarpálními kostmi a proximálními a mediálními články 2. a 3. prstu (bílá šipka; c), přičemž distální články zůstaly odděleny (a, c). Chybí jedna sezamská kost v oblasti metakarpofalangového kloubu 4. prstu (bílá šipka; a), přičemž i skloubení s proximálním článkem prstu je abnormální a projevuje se zakřivením prstu (a, c). Autopodium pravé přední končetiny je zasaženo kamptodaktylií (B), jež je patrná i na 3D skenu skeletu (b, d). Absence sezamské kosti je patrná v oblasti metakarpofalangového kloubu 3. prstu (bílá šipka; b). Měřítka udává vzdálenost 1 mm.

Na levé přední končetině je patrný rozštěp ve střední čáře v kombinaci s kompletní syndaktylií 2. a 3. prstu (obr. 19A, obr. 21A). Na μ CT skenu autopodia je syndaktylie patrná, došlo k synostóze jak metakarpálních kostí, tak i proximálního a mediálního článku 2. a 3. prstu (obr. 20), přičemž nedošlo k fúzování distálního článku těchto prstů (obr. 19a, c). V oblasti metakarpofalangového kloubu 4. prstu chybí jedna ze sezamských kostí (obr. 19a), přičemž také dochází k abnormálnímu skloubení metakarpální kosti a proximálního článku prstu, což se projevuje abnormálním zakřivením prstu (obr. 19a, c, obr. 21A). Došlo také k synostóze karpálních kostí na radiální straně autopodia (obr. 19a, c, obr. 20). Pravá končetina vykazuje mírně abnormální fenotyp se známkami kamptodaktylie, a to jak svým vnějším vzhledem (obr. 19B, obr. 21B), tak i na 3D skenu (obr. 19b, d). V oblasti metakarpofalangového kloubu 3. prstu chybí jedna ze sezamských kostí (obr. 19b).

Tento jedinec vykazuje přítomnost téměř pouze kostní tkáně, nicméně v některých oblastech (např. karpální kosti či distální konce metakarpálních kostí) vykazují přítomnost chrupavčité tkáně (obr. 21A, B).



Obrázek 20 **Detail levé přední končetiny jedince č. 2.** Zobrazeno dorzálně. Na detailu autopodia je zřetelná synostóza metakarpálních kostí 2. a 3. prstu, a taktéž fúzování karpálních kostí na radiální straně autopodia.



Obrázek 21 Projasněné přední končetiny se zaměřením na levé (A) a pravé (B) autopodium jedince č. 2. Zobrazeno dorzálně. U tohoto jedince je již převažující kostní tkáň, ale v oblasti distálních konců metakarpálních kostí a u karpálních kostí je zejména na levém autopodiu patrná přítomnost chrupavčité tkáně. Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

Jedinec č. 3

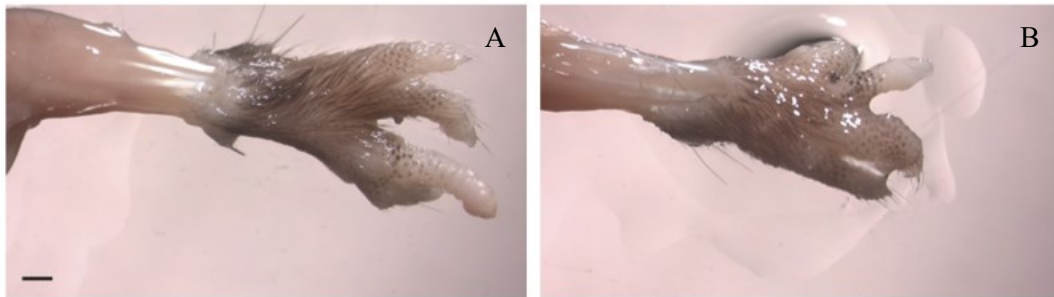
Základní informace: pohlaví – samice, věk – 10 týdnů, patologie – bilaterální.

U tohoto jedince jsou níže uvedeny pouze makroskopické fotografie se zachycenou vadou, μ CT skeny a metoda projasnění tkáně s barvením kostěné a chrupavčité tkáně nebyly zhotoveny z časových důvodů.

Patologie obou předních končetin tohoto jedince jsou velmi závažné a obě končetiny vykazují abnormální vývoj ve střední linii autopodia.

Na autopodiu levé přední končetiny je patrný rozštěp ve střední linii a změny velikosti a tvaru prstů. Především patrné jsou změny 3. prstu, který je abnormálně prodloužený, a taktéž prokazuje abnormální distální článek, který není zakončen drápem a zajímavá je i nepřítomnost chlupových folikulů na tomto prstu (obr. 22A).

Autopodium pravé končetiny tohoto jedince vykazuje abnormální vývoj v mediální oblasti. Druhý prst je velmi robustní, což mohlo být způsobeno syndaktylií, jež v tomto případě není potvrzena pomocí μ CT ani metodou projasnění. Zřejmá je opět změna morfologie 3. prstu, jež je zkrácený, a jehož distální polovina nevykazuje chlupové folikuly ani přítomnost drápu (obr. 22B).



Obrázek 22 **Autopodium levé (A) a pravé (B) přední končetiny jedince č. 3.** Zobrazeno dorzálně. Tento jedinec vykazuje bilaterální patologii předních končetin. Levé autopodium je zasaženo rozštěpem, 3. prst je abnormálně dlouhý, bez chlupových folikulů a bez drápu (A). Pravé autopodium vykazuje abnormálně robustní 2. prstu, a naopak 3. prst vykazuje zkrácenou délku a taktéž je bez ochlupení a bez drápu (B). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

Jedinec č. 4

Základní informace: pohlaví – samec, věk – 8 týdnů, patologie – unilaterální (levá přední končetina).

Na autopodiu levé přední končetiny je patrný rozštěp ve střední čáře, a také je zjevný snížený počet prstů – oligodaktylie (obr. 23A, obr. 24A). Oligodaktylie je potvrzena na 3D skenu skeletu (obr. 23a, c). Metakarpální kost 2. prstu je velmi robustní a nepravidelná (obr. 23c).

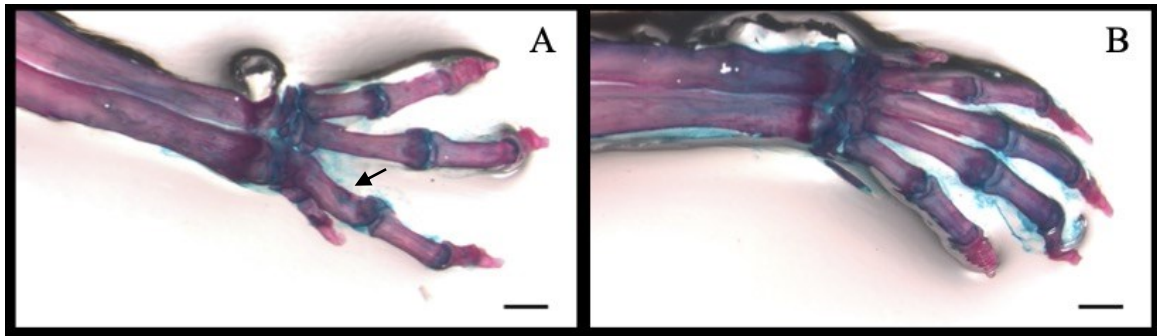
Pravá přední končetina zevně ani na 3D modelu nevykazuje žádné známky patologie (obr. 23A, b, d, 24B).

Na levém i pravém autopodiu předních končetin tohoto jedince je stále přítomná chrupavčitá tkáň, a to především v oblasti metakarpofalangového kloubu, tedy na distálních koncích metakarpálních kostí a proximálních koncích proximálních článků prstů. Distální články prstů jsou již zcela bez přítomnosti chrupavčité tkáně (obr. 24A). Na těle 4. metakarpu levého autopodia, který má zřetelně robustnější povrch, je medio-dorzálně přítomna chrupavčitá oblast (obr. 24A).

Autopodium pravé přední končetiny lze i v rámci této metody z hlediska anatomické stavby vyhodnotit jako normálně vypadající (obr. 24B).



Obrázek 23 Autopodium levé (A, a, c) a pravé (B, b, d) přední končetiny jedince č. 4. Vnější vzhled patologie (A, B), 3D skeny skeletu palmárně (a, b) a dorzálně (c, d) Autopodium levé přední končetiny jedince č. 4 vykazuje rozštěp ve střední čáře a oligodaktylii (A), která byla potvrzena i ve 3D zobrazení skeletu (a, c). Druhá metakarpální kost je abnormálně robustní (c). Pravá končetina jedince nevykazuje žádné známky patologického vývoje (B, b, d). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.



Obrázek 24 Projasněné přední končetiny se zaměřením na levé (A) a pravé (B) autopodium jedince č. 4. Zobrazeno dorzálně. Obě končetiny nesou známky přítomnosti chrupavčité tkáně na distálních koncích metakarpálních kostí a proximálních koncích proximálních článků prstů, distální články prstů jsou plně osifikované (A, B). Druhá metakarpální kost levého autopodia má robustní povrch a na jejím těle se v medio-dorzální oblasti nachází oblast chrupavčité tkáně (černá šipka, A), a zároveň je patrný srůst proximálního konce této kosti s karpálními kostmi na radiální straně (a). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

Jedinec č. 5

Základní informace: pohlaví – samice, věk – 8 týdnů, patologie – unilaterální (levá přední končetina).

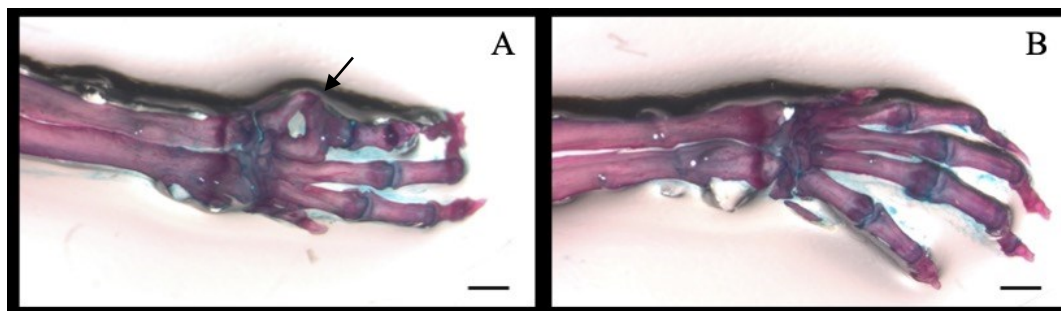
Deformace autopodia levé přední končetiny se projevuje jako oligodaktylie (obr. 25A, obr. 26A) a částečná syndaktylie. Patologie skeletu jsou zjevné především v oblasti metakarpálních kostí, u nichž došlo k četným synostózám. Výrazná je fúze 4. a 5. metakarpální kosti, a to jak v oblasti jejich proximálních, tak i distálních konců, přičemž těla kostí nefúzovala (obr. 25a, b, obr. 26A). V oblasti distálního konce tohoto útvaru došlo také k fúzování sezamských kostí a proximálního článku prstu (obr. 25a) a následného připojení mediálního a distálního článku 5. prstu (obr. 25a, c). Pro prst 4. prstu chybí proximálně kostěný základ, respektive 4. metakarpální kost, která fúzovala s 5. metakarpální kostí. Kostěný pozůstatek distálního konce 4. prstu ve formě zfúzovaných článků se vyskytuje v oblasti distálního konce 3. prstu, mezi nimiž došlo k synostóze (obr. 25a, c).

Pravá přední končetina zevně ani na 3D skenu skeletu nevykazuje žádné známky patologie (obr. 25B, b, d, obr. 26B).

U obou předních končetin je stále přítomna chrupavčitá tkáň v oblasti metakarpofalangového kloubu a v oblasti karpálních kostí (obr. 26A, B).



Obrázek 25 Autopodium levé (A, a, c) a pravé (B, b, d) přední končetiny jedince č. 5. Vnější vzhled patologie (A, B), 3D skeny skeletu palmárně (a, b) a dorzálně (c, d). U jedince č. 5 je patrná oligodaktylie (A), která je výsledkem četných synostóz skeletu. Došlo k fúzi 4. a 5. metakarpální kosti v oblasti jejich proximálních i distálních konců, nicméně bez fúzování těl těchto kostí. K tomuto útvaru fúzoval proximální článek prstu a sezamské kosti (bílá šipka, a) a napojuje se k němu taktéž mediální a distální článek 5. prstu (oranžová šipka, a, c). Pro prst 4. prstu chybí kostěný základ v podobě metakarpální kosti a pozůstatek tohoto prstu ve formě fúzovaných článků srůstá distálně s distálním článkem 3. prstu (a, c). Pravá přední končetina nevykazuje žádné patologické změny (B, b, d). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.



Obrázek 26 **Projasněné přední končetiny se zaměřením na levé (A) a pravé (B) autopodium jedince č. 5.** Zobrazeno dorzálně. Pozorovatelný je především projev patologie na ulnární polovině autopodia. Je patrné fúzování 4. a 5. metakarpální kosti s proximálním článkem prstu, nicméně spojení je částečně tvořeno kloubem (černá šipka, a). V oblasti distálního konce 3. prstu se nachází pozůstatek po 4. prstu v podobě mediálního a distálního článku. Tomuto útvaru chybí kostěný základ v podobě metakarpální kosti a proximálního článku (A, a). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

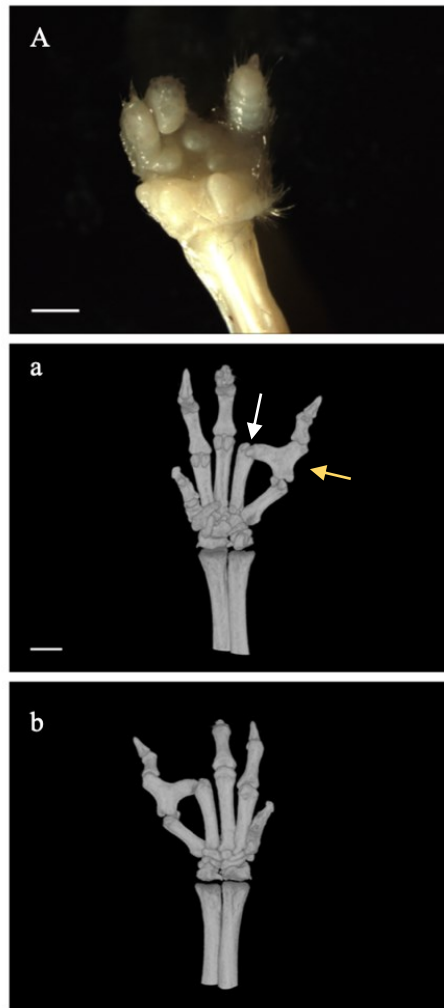
Jedinec č. 6

Základní informace: pohlaví – samec, věk – 6 týdnů, patologie – unilaterální (levá přední končetina).

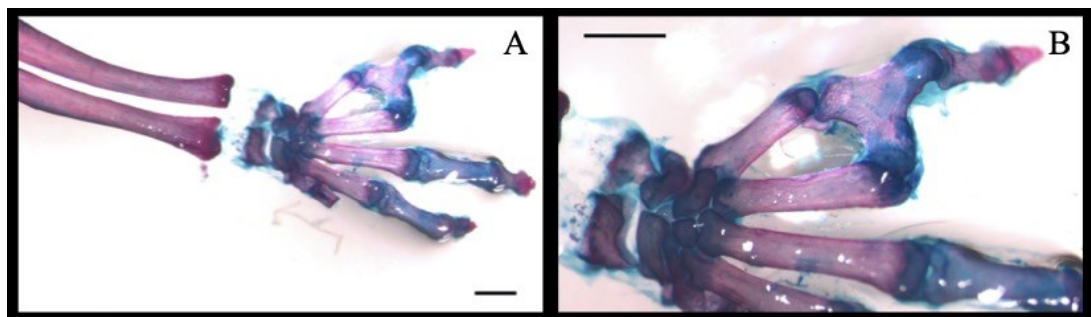
U autopodia levé přední končetiny došlo ke změně v počtu prstů – oligodaktylii (obr. 27A). Skelet končetiny vykazuje abnormální fúze kostí. Došlo k synostóze proximálních článků 4. a 5. prstu, které splynuly v jeden kostěný útvar (obr. 27a, b, obr. 28A, B), k němuž také fúzovaly sezamské kosti, výraznější splynutí je patrnější na distálním konci 4. metakarpální kosti (obr. 27a).

Pravá přední končetina jedince č. 6 zevně nevykazovala žádné známky patologie.

V oblasti distálních konců metakarpálních kostí a proximálních konců článků prstů je stále patrná chrupavčitá tkáň, taktéž v oblasti karpálních kostí (obr. 28A, B).



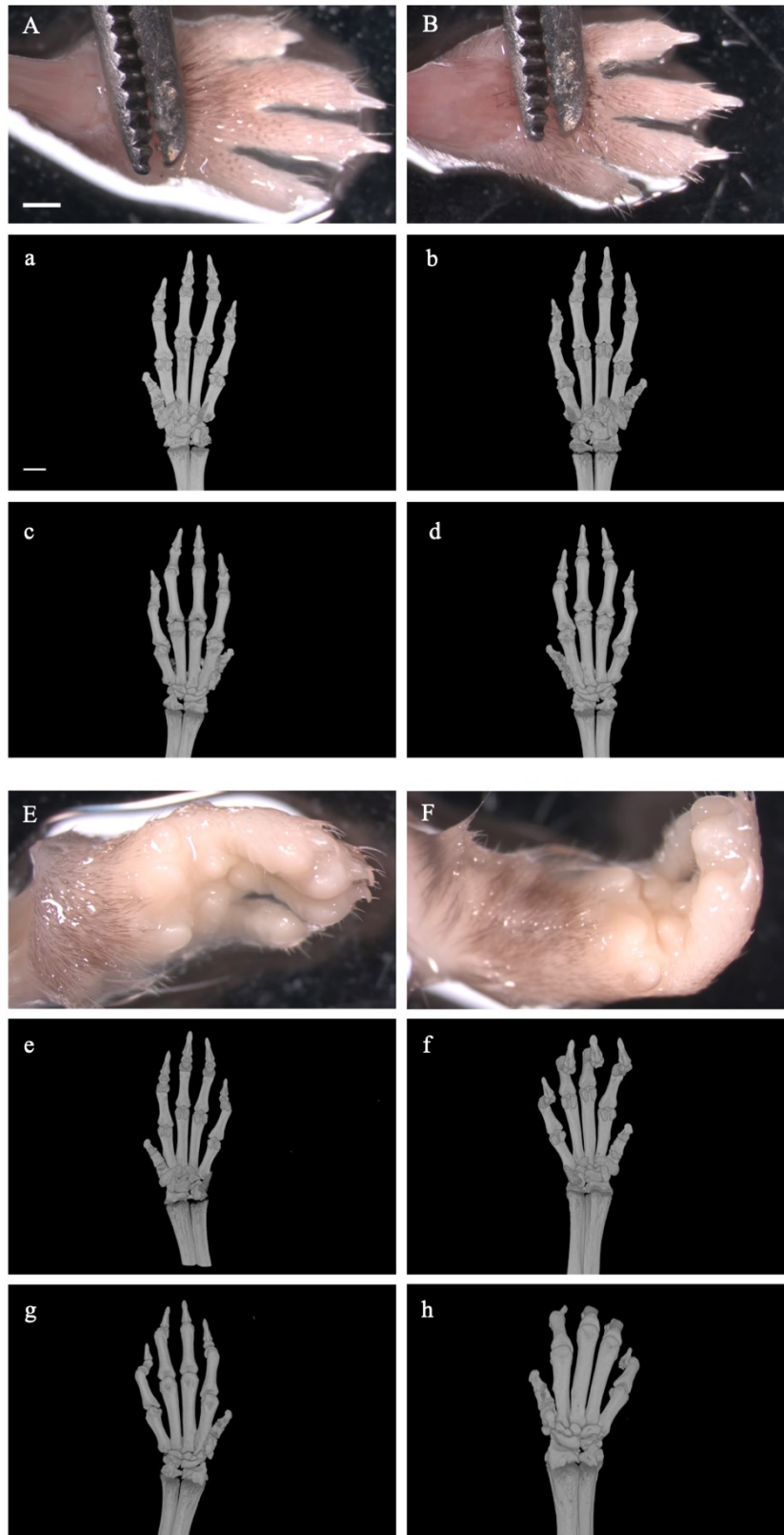
Obrázek 27 **Autopodium levé přední končetiny jedince č. 6 (A, a, b)**. Vnější vzhled patologie (A), 3D skeny skeletu palmárně (a) a dorzálně (b). Levé autopodium je postižené oligodaktylií (A). Proximální články 4. a 5. prstu fúzovaly a vytvořily jeden útvar (žlutá šipka; a, b), k němuž fúzovala i sezamská kost v oblasti metakarpofalangového kloubu 4. prstu (bílá šipka; a). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

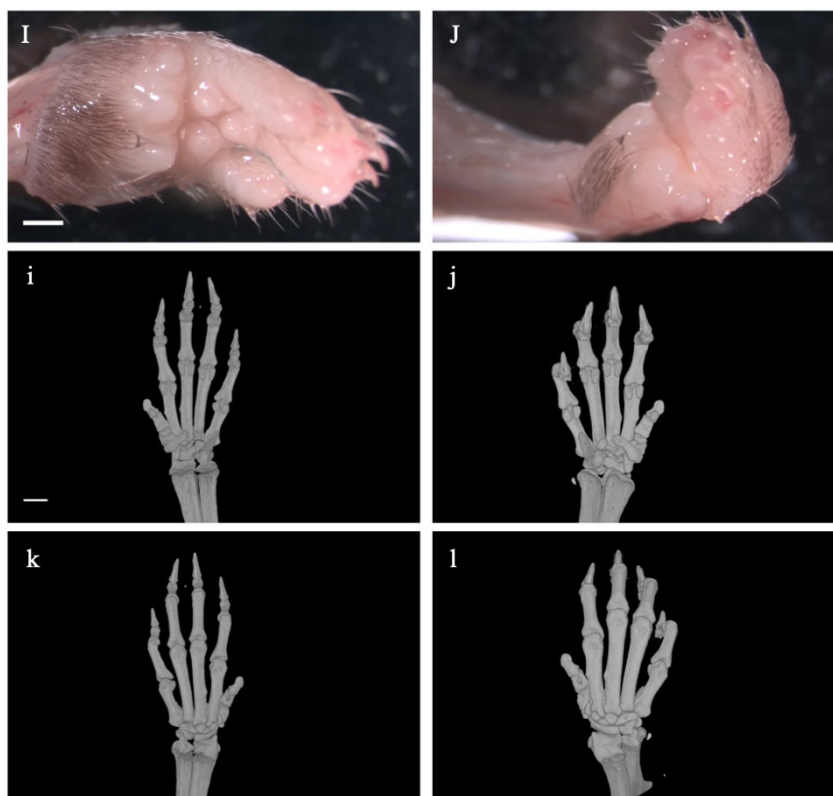


Obrázek 28 **Projasněná levá přední končetina se zaměřením na autopodium jedince č. 6**. Zobrazeno dorzálně. V oblastech distálních konců metakarpálních kostí a proximálních konců proximálních článků prstů je viditelná chrupavčitá tkáň (A, B). Patrná je především úplná synostóza proximálních článků 4. a 5. prstu (B). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

10.1.2 Jedinci *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} bez zjevné patologie předních končetin

V rámci studie bylo také zachyceno 8 jedinců s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, kteří nevykazovali žádnou vnější patologii (obr. 29A-h). Pro potvrzení této skutečnosti byly také





Obrázek 29 Přední končetiny postnatálních jedinců bez zjevné patologie v porovnání s kontrolním jedincem. Levá autopodia (A, a, c; E, e, g; I, i, k) a pravá autopodia (B, b, d; F, f, h; J, j, l). Vnější vzhled autopodia (A, B; E, F; I, J), 3D skeny skeletu palmárně (a, b; e, f; i, j) a dorzálně (c, d; e, f; k, l). Uvedení vybraní jedinci s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, kteří svým vnějším vzhledem ani stavbou skeletu nevykazovali žádnou patologii autopodia předních končetin (A-h). Pro porovnání je uveden kontrolní jedinec *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{+/-} (I-l). Měřítka udává vzdálenost 1 mm.

zhotoveny 3D skeny skeletu metodou μ CT (obr. 29a-d, c-h). Tito jedinci vykazovali normální anatomickou stavbu autopodia předních končetin ve srovnání s kontrolním jedincem *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{+/-} (obr. 29I-l).

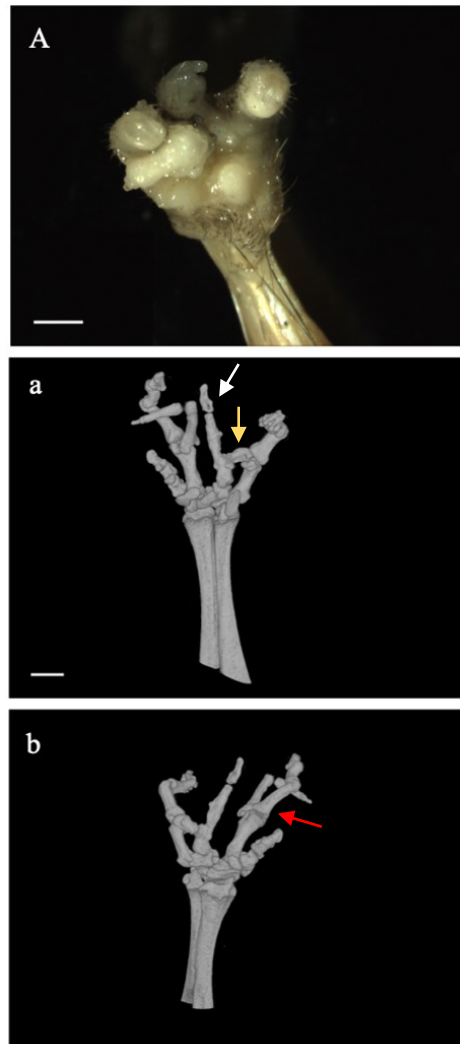
10.1.3 Patologie autopodia předních končetin jedinců s genotypem *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-}

K patologiím autopodia předních končetin docházelo také u myši s genotypem *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-}, nicméně po dobu této studie byly zachyceny pouze 2 postnatální myši s tímto genotypem, které vykazovaly vadu předních končetin.

Jedinec č. 7

Základní informace: pohlaví – samice, věk – 16 týdnů, patologie – unilaterální (levá přední končetina).

Jedinec č. 7 vykazuje rozsáhlé deformity autopodia levé přední končetiny. Zřetelné je abnormální postavení prstů a jejich zakřivení (obr. 30A, obr. 32A). Skeletální struktura

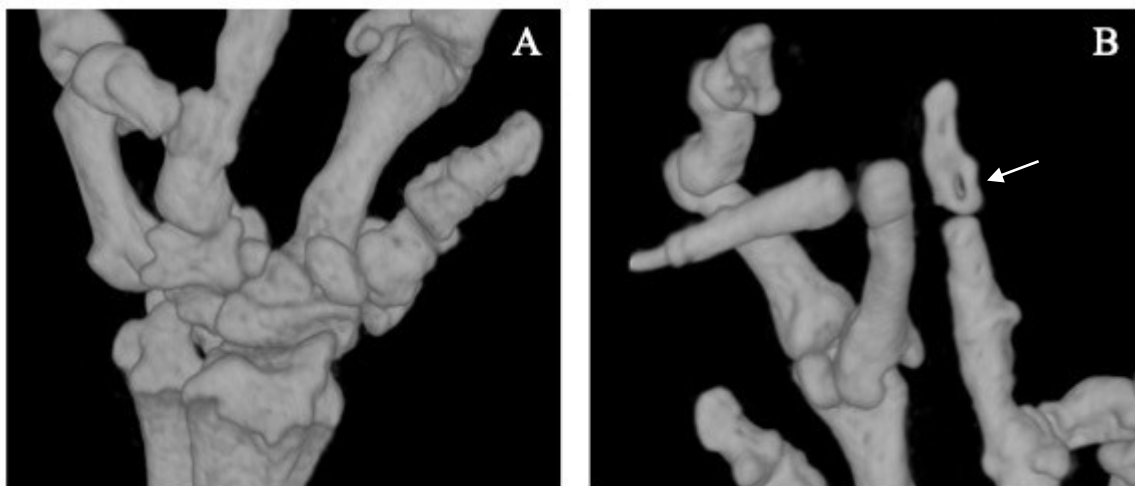


Obrázek 30 Autopodium levé přední končetiny jedince č. 7 (A, a, b). Vnější vzhled patologie (A), 3D skeny skeletu palmárně (a) a dorzálně (b). U tohoto jedince došlo na levém autopodiu přední končetiny k rozsáhlým deformitám, projevujícím se abnormálním postavením prstů a jejich zakřivení (A). Velmi četné jsou synostózy ve všech částech autopodia. Nejzřetelnější je fúze 4. a 5. metakarpální kosti, mezi nimiž je abnormálně uložena kost (oranžová šipka; a, b). Dále došlo k synostóze metakarpální kosti a článků u 4. prstu, přičemž distální článek zůstal částečně oddělen a na jehož distálním konci se nachází abnormální otvor (bílá šipka; a). K metakarpofangovému kloubu 2. prstu je patologicky připojený kostěný pozůstatek 3. prstu, a to ve formě částečně fúzovaných článků prstů (červená šipka; b). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

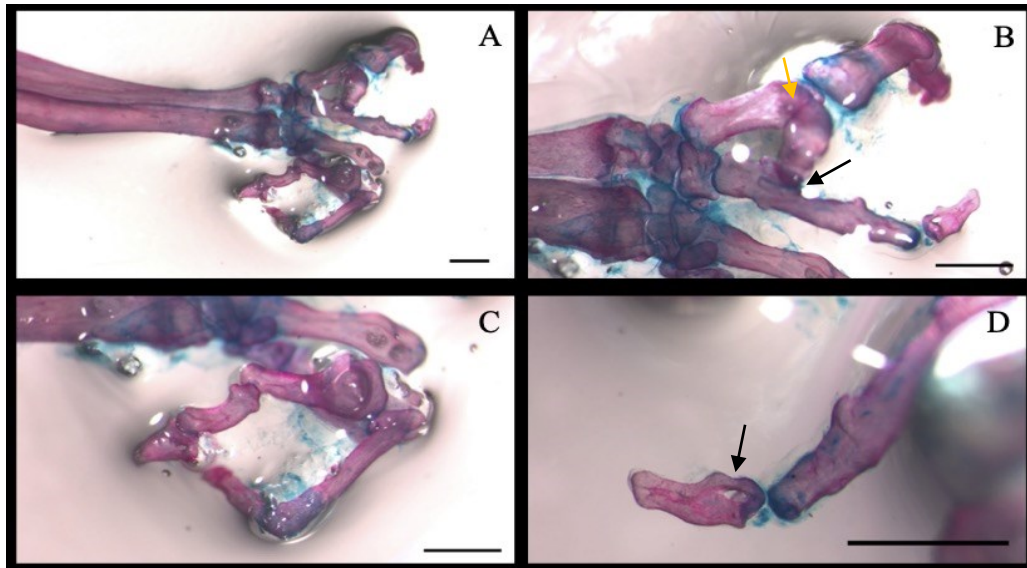
tohoto autopodia je výrazně deformovaná převážně vlivem vysokého počtu abnormálních synostóz a fúzování rozličných částí autopodia.

Některé karpální kosti vykazují známky fúzování, a to především radiálně (obr. 31A). Všechny metakarpální kosti nesou známky patologického vývoje. Zcela chybí 3. metakarpální kost, 4. a 5. metakarpální kost jsou na svém distálním konci částečně srostlé a propojeny prostřednictvím abnormálně uložené kosti. V této oblasti došlo i k fúzování sezamských kostí (obr. 30a). U prstu 4. došlo k synostóze metakarpální kosti i článků prstů. Distální článek, který je částečně oddělen, vykazuje abnormalitu v ucelenosti své kostěné tkáně a v jeho proximální oblasti se vytvořil otvor (obr. 30a, obr. 31B, obr. 32D). V oblasti metakarpofalangového kloubu 2. prstu došlo k napojení článků pravděpodobně 3. prstu, které také částečně fúzovaly (obr. 30a, obr. 31B, obr. 32C).

Pravá přední končetina jedince č. 7 zevně nevykazovala žádné známky patologie. Pomocí projasnění bylo zjištěno, že kosti končetiny jsou plně osifikovány (obr. 32A-D).



Obrázek 31 Detail skeletu levé přední končetiny jedince č. 7. Zobrazeno dorzálně – A, palmárně – B. U tohoto jedince došlo k fúzování karpálních kostí, přičemž nejzřetelnější je tato patologie na radiální straně autopodia (A). K metakarpofalangovému kloubu je palmárně připojený možný pozůstatek 3. prstu, jehož články částečně fúzovaly (B). Taktéž je patrná neucelená kostní tkáň distálního článku 4. prstu (bílá šipka, B).



Obrázek 32 **Projasněná levá přední končetina se zaměřením na autopodium jedince č. 7.** Zobrazeno dorzálně (A, B, C), palmárně (D) se zaměřením na oblast jednotlivých prstů (C, D). Končetina vykazuje převážně kostní tkáň. Celkově lze říct, že u této patologické končetiny byla narušena její anatomická stavba značným množstvím kombinovaných vad. Ulnárně došlo ke srůstu kostí s přítomností nadbytečné kosti, jež se napojuje na kloubní plošku na těle 4. prstu (černá šipka; B). V rámci tohoto útvaru bylo zaznamenáno ještě jedno kloubní spojení (oranžová šipka, B). Paprsek 4. prstu vykazuje synostózu téměř v celé své délce, pouze distální článek je oddělen a v jeho těle se nachází otvor (černá šipka; D). Na metakarpofalangový kloub 2. prstu se napojuje pozůstatek pravděpodobně 3. prstu, a to ve formě částečně srostlých článků (A, C).

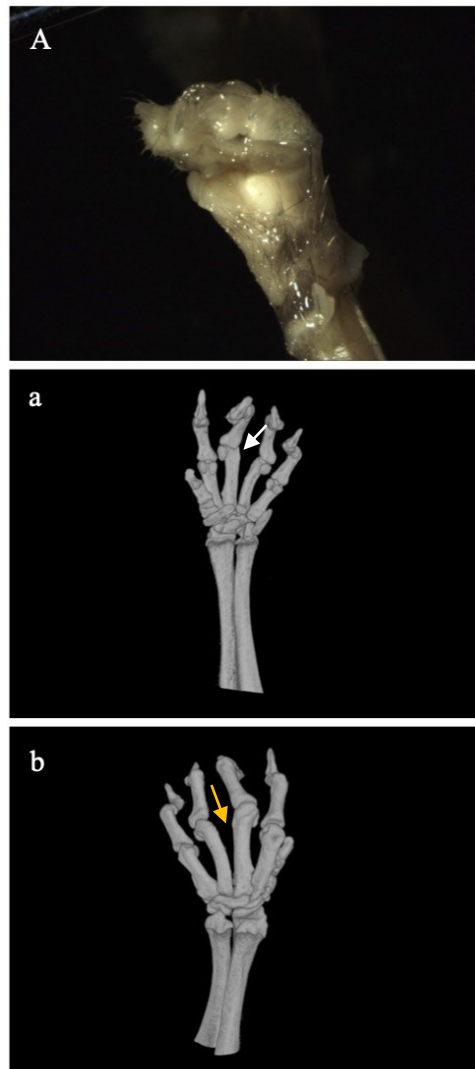
Jedinec č. 8

Základní informace: pohlaví – samice věk – 14 týdnů, patologie – unilaterální (levá přední končetina).

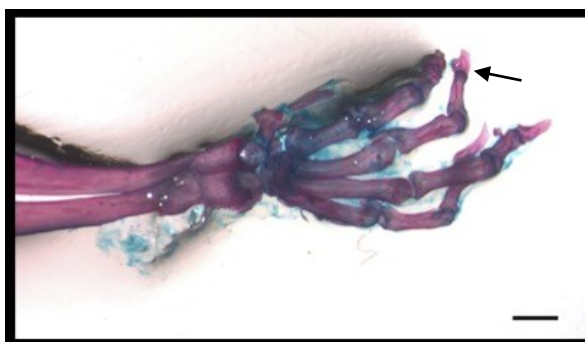
Levá přední končetina tohoto jedince nevykazuje závažný defekt, nicméně patrné je zakřivení jednotlivých prstů (obr. 33A, obr. 34A). Dle 3D skenu skeletu lze konstatovat, že došlo k zakřivení jednotlivých článků prstů, především patrná je tato změna tvaru na proximálním článku 3. a 4. prstu. V souvislosti s tvarovými změnami došlo také k abnormálnímu skloubení zmíněných proximálních článků a metakarpálních kostí paprsku 3. a 4. prstu (obr. 33a, b), přičemž v oblasti těchto metakarpofalangových kloubů chybí sezamské kosti (obr. 33a). V důsledku všech těchto změn je u tohoto jedince patrná kamptodaktylie (obr. 33A, a, b, 34A).

Pravá přední končetina jedince č. 8 zevně nevykazovala žádné známky patologie.

Na kostře je patrná převážně kostní tkáň, v místech kloubních spojů dlouhých kostí v rámci autopodia jsou zřetelné zbytky chrupavčité tkáně. Patrné je zakřivení některých prstů a v těle autopodia jsou zřetelné zbytky chrupavčité tkáně (obr. 34).



Obrázek 33 Autopodium levé přední končetiny jedince 8 (A, a, b). Vnější vzhled patologie (A), 3D skeny skeletu palmárně (a) a dorzálně (b). Autopodium levé přední končetiny tohoto jedince nevykazuje závažnou patologii, nicméně je viditelné zakřivení prstů – kamptodaktylie (A). Abnormální tvar článků prstů je zřetelně rozpoznatelný na 3D skenu skeletu. V důsledku těchto tvarových změn došlo k abnormálnímu kloubnímu spojení mezi metakarpální kostí a proximálními články prstů především u 3. a 4. prstu (oranžová šipka; b), v téže oblasti chybí sezamské kosti (bílá šipka; a). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.



Obrázek 34 **Projasněná levá přední končetina se zaměřením na autopodium jedince č. 8.** Zobrazeno dorzálně. Kostní tkáň převažuje, chrupavčitá se nachází v oblasti kloubních spojů dlouhých kostí autopodia. Patrné je mírné zakřivení jednotlivých kostí, a také otvor uprostřed distálního článku 3. prstu (černá šipka). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

10.2 Prenatální studie

V rámci prenatální části studie jsem se zaměřila na longitudinální analýzu vývoje patologií předních končetin myších embryí v rozmezí ED 11,5 až 18,5. Přehled jednotlivých patologií byl stanovován od ED 12,5, jelikož od tohoto vývojového stádia jsou patologie zřetelné již makroskopicky.

Celkem bylo zachyceno 14 embryí genotypu *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, z čehož jich 7 vykazovalo bilaterální defekt autopodia předních končetin. Sedm jedinců vykazovalo unilaterální deformitu autopodia – pravostranná vada byla zachycena u 4 jedinců, levostranná vada u 3 jedinců. S genotypem *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-} bylo zachyceno 6 embryí, z čehož pouze 3 vykazovala patologii předních končetin. Dvě embrya vykazovala bilaterální patologii a jedno embryo unilaterální deformitu autopodia na pravé přední končetině.

Zcela nejčastější patologií byl rozštěp v mediální oblasti autopodia. Tato patologie byla zachycena u 12 jedinců, přičemž 4 embrya vykazovala bilaterální vadu. V 9 případech se jednalo o vadu levostrannou a v 7 případech o pravostrannou vadu končetiny. Druhou nejčastější vadou byla syndaktylie, jež se projevila u 10 jedinců, z čehož u 3 jedinců byla tato vada bilaterální, přičemž na levém autopodiu byla vada zachycena v 7 případech, v 6 případech na pravém autopodiu.

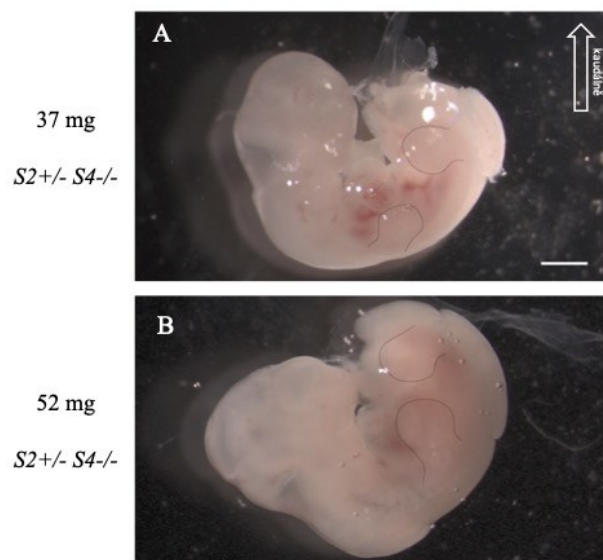
U embryí byl taktéž zachycen rozštěp mimo mediální oblast, a to 2krát u levé končetiny a 3krát u pravé končetiny. U 3 jedinců byl zachycen nadpočetný prst (polydaktylie) na levé končetině a u 1 jedince na pravé končetině. Opačný případ změny

počtu prstů, tedy oligodaktylie, byla zachycena u 2 jedinců, jednou na pravé a jednou na levé končetině.

Mezi další patologické změny končetin objevující se s menší četností patřily změny ve velikosti prstů a abnormální vývoj v oblasti střední linie autopodia (vyčlenění středního nadbytečného prstu).

Embryonální stádium 11,5

V embryonálním stádiu 11,5 byla zachycena dvě embrya s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, nicméně v tomto vývojovém stádiu nelze konstatovat přítomnost či případný projev vady přední končetiny pouhým makroskopickým prozkoumáním, jelikož v tomto ED nejsou končetiny ještě v dostatečně pokročilém stádiu vývoje (obr. 35A, B).



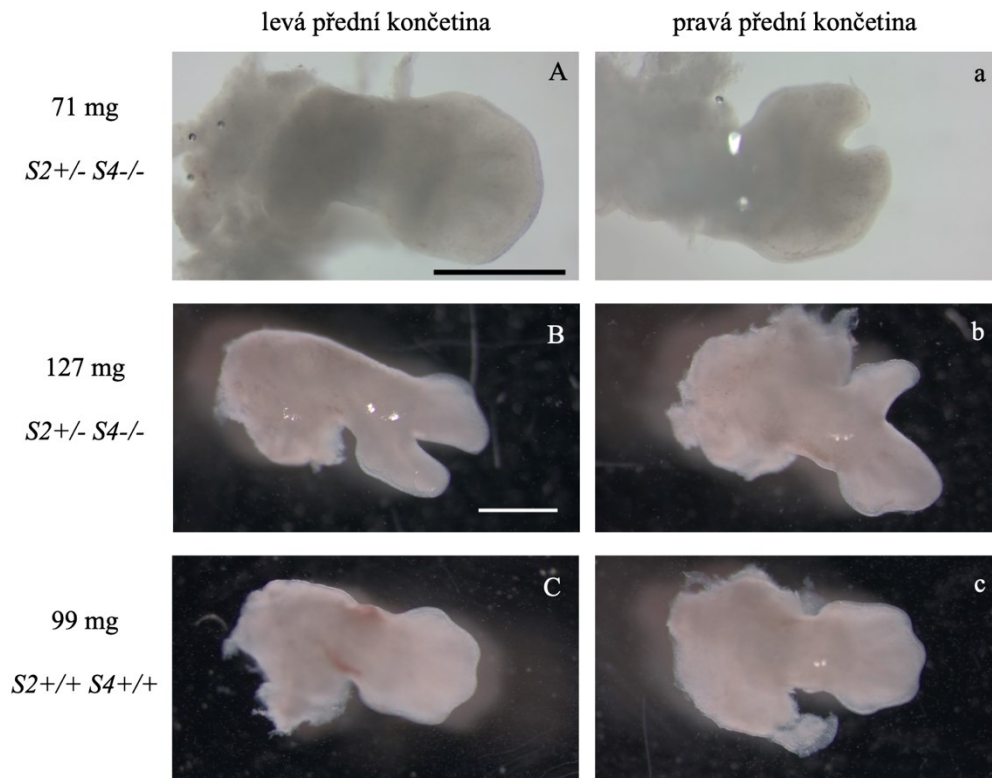
Obrázek 35 **Embryonální stádium 11,5**. Dvě embrya s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, končetiny jsou pro lepší orientaci znázorněny černou linií. Na základě těchto embryí lze konstatovat, že fenotypový projev vad na předních končetinách je možné pozorovat až od ED 12,5.

Embryonální stádium 12,5

V prenatalním stádiu 12,5 ED byly zachyceni dva jedinci s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} s patologickým vývojem předních končetin. Byla také zachycena dvě embrya s genotypem *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-}, která však nevykazovala žádný defekt předních končetin (viz tab. 1).

První jedinec (71 mg, obr. 36A, a) je zasažen unilaterální patologií na pravé přední končetině. Vada se projevuje jako rozštěp ve střední linii (obr. 36a).

Druhý jedinec (127 mg, obr. 36B, b) vykazuje bilaterální fenotyp předních končetin. Na levém autopodiu je patrný rozštěp ve střední linii (obr. 36B), přičemž na pravém autopodiu je taktéž patrný rozštěp, nicméně je radiálně (obr. 36b).



Obrázek 36 **Přední končetiny embryí v embryonálním stádiu 12,5.** U prvního jedince (71 mg; *Spry2+/- Spry4-/-*) je patrná patologie pouze na pravé přední končetině, která se projevuje jako rozštěp ve střední linii (a). U druhého jedince (127 mg; *Spry2+/- Spry4-/-*) je vada bilaterální. Levá přední končetina vykazuje rozštěp ve střední čáře (A), na pravé přední končetině je patrný rozštěp na radiální straně (B). Na obrázcích a, b jsou zobrazeny přední končetiny jedince (99 mg) s genotypem *Spry2+/+ Spry4+/+* (kontrolní), u něhož je vývoj končetin nenarušený. Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

Embryonální stádium 13,5

V embryonálním stádiu 13,5 ED bylo zachyceno celkově pět embryí s patologickým vývojem předních končetin. Tři embrya byla s genotypem *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-} a dvě embrya *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}. V tomto embryonálním stádiu vykazovala bilaterální patologii celkem čtyři embrya (obr. 37A, B; C, D; E, F a obr. 38A) a unilaterální (pravostrannou vadu) jedno embryo (obr. 37H).

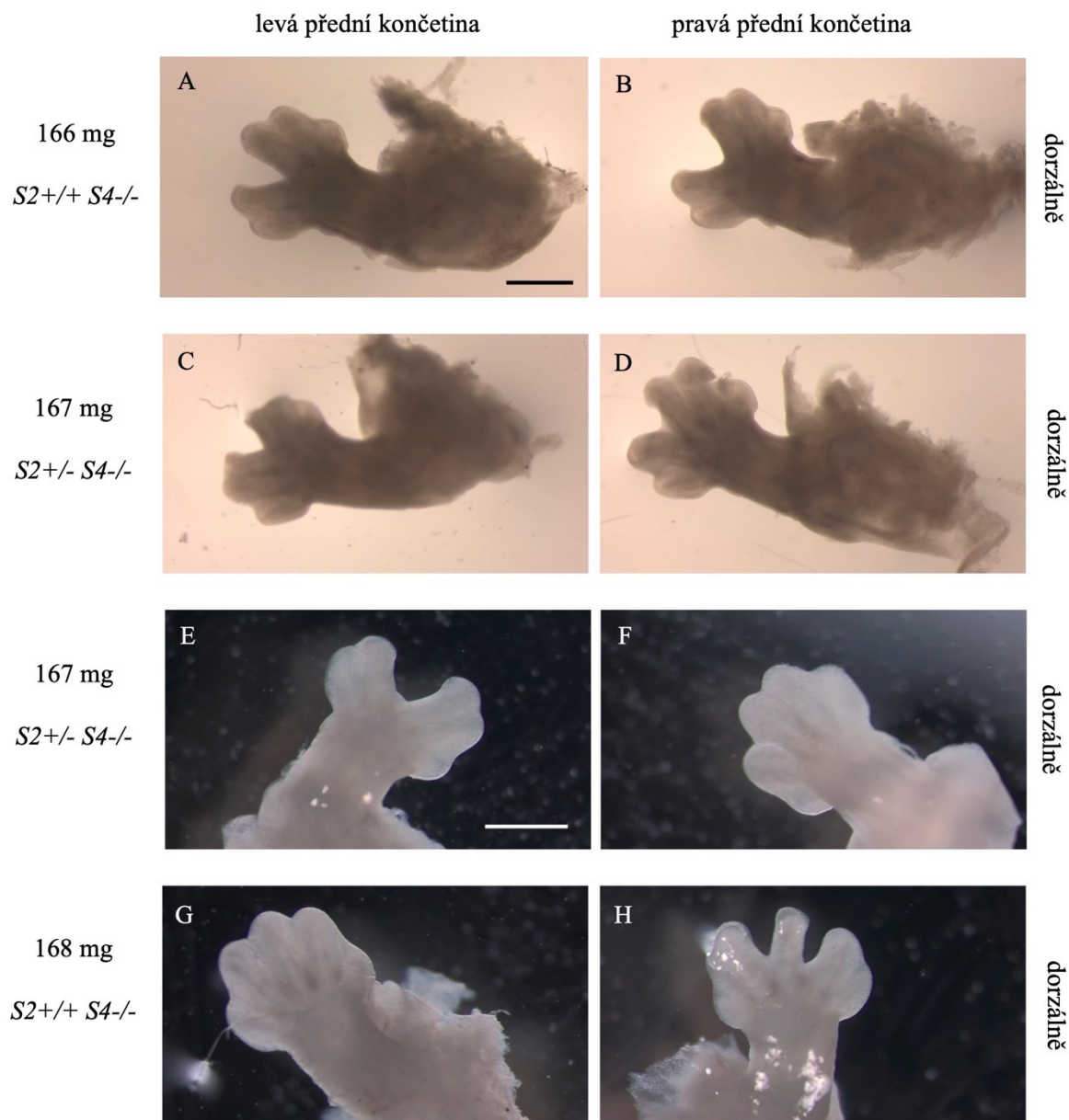
První jedinec (166 mg, *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-}, obr. 37A, B) vykazuje bilaterální patologii. Obě přední končetiny vykazují rozštěp ve střední linii autopodia (obr. 37A, B).

Druhý jedinec (167 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 37C, D) je také zasažený bilaterální patologii autopodia. Na levé končetině je zřejmý rozštěp ve střední linii, pravděpodobně doprovázený polydaktylií (obr. 37C). Pravá končetina vykazuje taktéž rozštěp autopodia ve střední linii (obr. 37D).

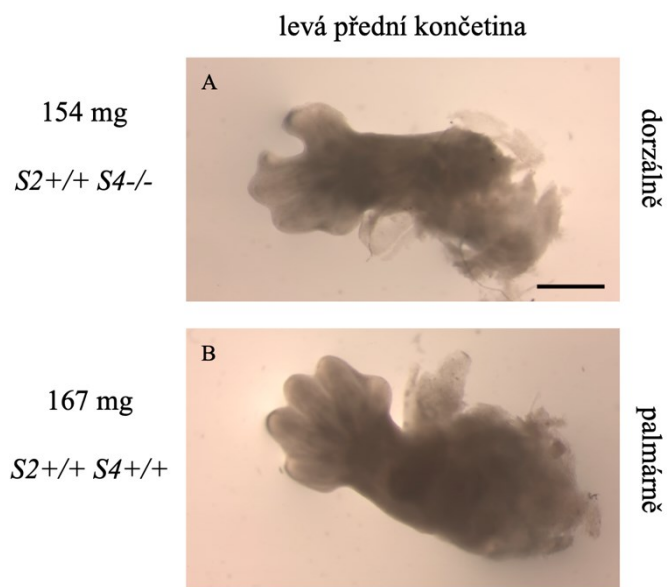
Třetí jedinec (167 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 37E, F) vykazuje na levém autopodiu závažný rozštěp ve střední čáře (obr. 37E), zatímco na pravé straně je patologie méně závažná a projevuje se narušeným vývojem autopodia distálně mezi 2. a 3. prstem (obr. 37F).

Čtvrtý jedinec (168 mg, *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-}, obr. 37G, H) vykazuje unilaterální patologii. Levá končetina je bez zjevné patologie (obr. 37G), nicméně na pravém autopodiu je patrná rozsáhlá patologie (obr. 37H). Ve střední linii se nachází nadpočetný prst v kombinaci s rozštěpem na ulnární i radiální straně. Také došlo k fúzi 1. a 2. prstu a 4. a 5. prstu.

Na obr. 38A je zobrazena levá přední končetina dalšího embrya v ED 13,5. Tento jedinec (154 mg, *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-}) vykazoval oboustrannou patologii. Autopodium levé přední končetiny je zasaženo rozštěpem lokalizovaným na radiální straně (obr. 38A), u pravé končetiny byla detekována patologie ve střední oblasti autopodia (fotografie neuvedena z důvodu poškození tkáně při odběru).



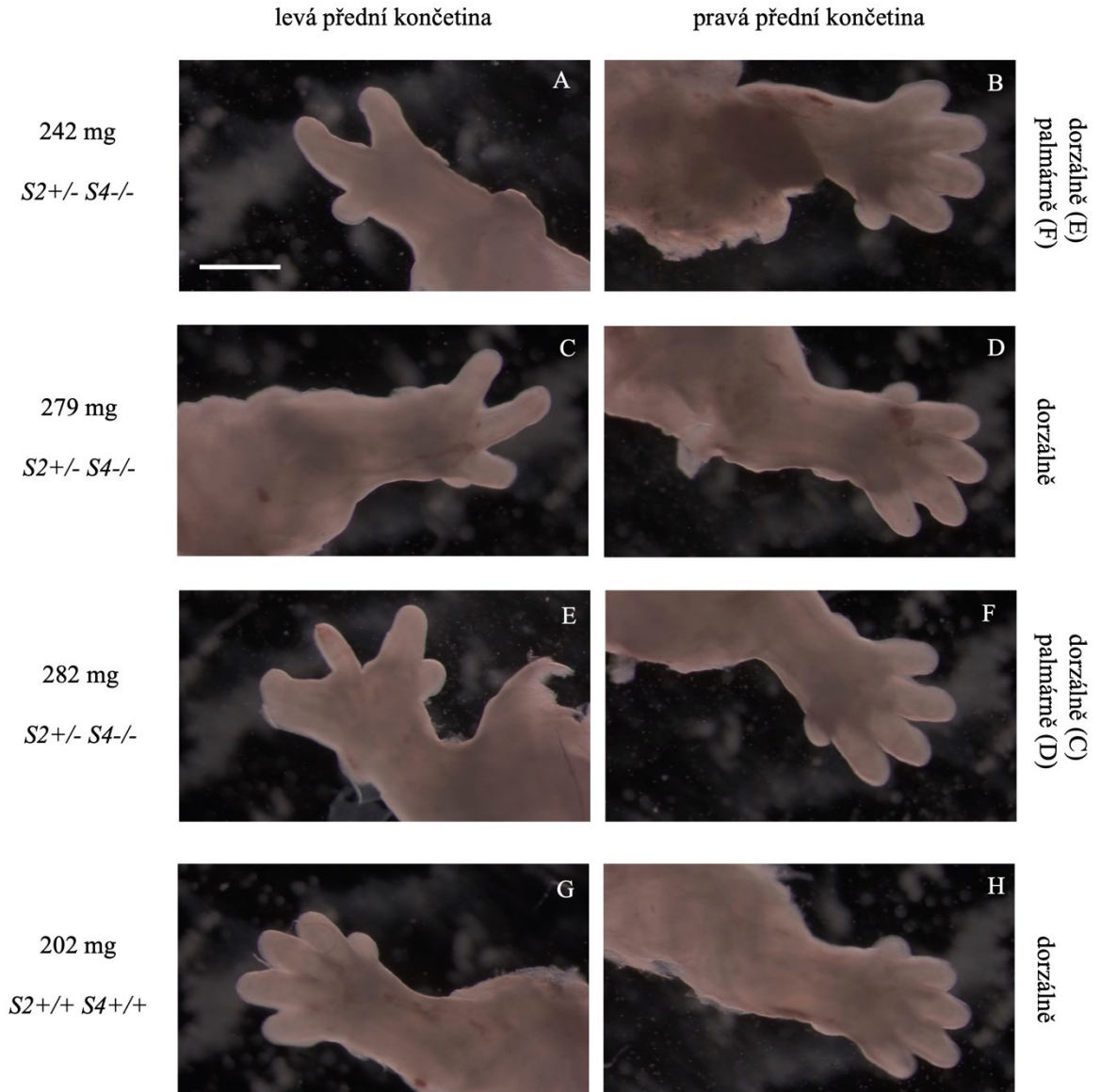
Obrázek 37 Končetiny čtyř jedinců v embryonálním stádiu 13,5 vykazujících patologie předních končetin. První jedinec (166 mg; *Spry2+/+ Spry4-/-*) vykazuje oboustrannou vadu, přičemž obě končetiny jsou zasažené rozštěpem ve střední čáře (A, B). Druhé embryo (167 mg; *Spry2+/- Spry4-/-*) má přítomnou patologii na obou předních končetinách. Levé autopodium vykazuje rozštěp ve střední čáře, pravděpodobně v kombinaci s polydaktylií (C). Pravé autopodium taktéž vykazuje rozštěp ve střední linii (D; při odběru embrya byla tato končetina mírně poškozena v oblasti 4. prstu). Třetí jedinec (167 mg; *Spry2+/- Spry4-/-*) s bilaterálním fenotypem. Levá končetina vykazuje rozštěp ve střední čáře (E), zatímco pravá přední končetina vykazuje pouze minoritní vadu ve formě distálního narušení mezi 2. a 3. prstem (F). Čtvrtý jedinec (168 mg; *Spry2+/+ Spry4-/-*) má vadou zasaženou pouze pravou končetinu, u které došlo k vytvoření nadpočetného prstu ve střední linii v kombinaci s rozštěpem na ulnární i radiální straně (H), levá končetina nevykazuje vadu (G). Měřítka udávají vzdálenost 1 mm.



Obrázek 38 Levé přední končetiny dalších embryonálních jedinců (ED 13,5), u nichž během odběru došlo k poškození pravých končetin (data neuvedena). První jedinec (154 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}) vykazoval bilaterální patologii. Levé autopodium bylo zasaženo rozštěpem na radiální straně (A). Jedinec na obr. B (167 mg, *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{+/+}) je kontrolní, zde je uvedena jeho levá přední končetina. Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

Embryonální stádium 14,5

V embryonálním stádiu 14,5 byla celkově zachycena tři embrya s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} vykazující patologie předních končetin, přičemž všechna byla zasažena unilaterální patologií na levé přední končetině.



Obrázek 39 Přední končetiny jedinců vembryonálním stádiu 14,5. Všichni tři zachycení jedinci s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} vykazují fenotyp unilaterální na levé přední končetině (A, C, E), pravé přední končetiny jsou bez viditelných fenotypových projevů (B, D, F). U prvního jedince (242 mg) došlo k vytvoření rozštěpu ve střední linii v kombinaci se syndaktylií 3. a 4. prstu (A). Druhý jedinec (279 mg) vykazuje oligodaktylii (C), třetí jedinec (282 mg) má levé autopodium zasaženo syndaktylií 1. a 2. prstu a také i syndaktylií 3., 4. a 5. prstu, přičemž prst ve střední linii je nadpočetný (E). Čtvrtý jedinec (202 mg, *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{+/+}) je kontrolní (levá končetina – G, pravá končetina – H). Měřítka udávají vzdálenost 1 mm.

První jedinec (242 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 39A, B). Autopodium levé přední končetiny tohoto jedince vykazuje kombinaci patologií. Zřetelný je rozštěp ve střední linii v kombinaci se syndaktylií 3. a 4. prstu (obr. 39A). Na pravé přední končetině není zjevná žádná patologie (obr. 39B).

Druhý jedinec (279 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 39C, D) má autopodium levé přední končetiny zasažené oligodaktylií, která je pravděpodobně způsobena syndaktylií prstů ve střední linii (obr. 39C). Na pravé přední končetině není zjevná žádná patologie (obr. 39D).

Třetí jedinec (282 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 39E, F) vykazuje patologický vývoj autopodia pouze na levé přední končetině. Došlo k syndaktylii 1. a 2. prstu, taktéž i 3., 4. a 5. prstu, přičemž došlo k abnormálnímu vývoji ve střední linii autopodia. Osamocený prst ve středu je nadpočetný (obr. 39E). Na pravé přední končetině není zjevná žádná patologie (obr. 39F).

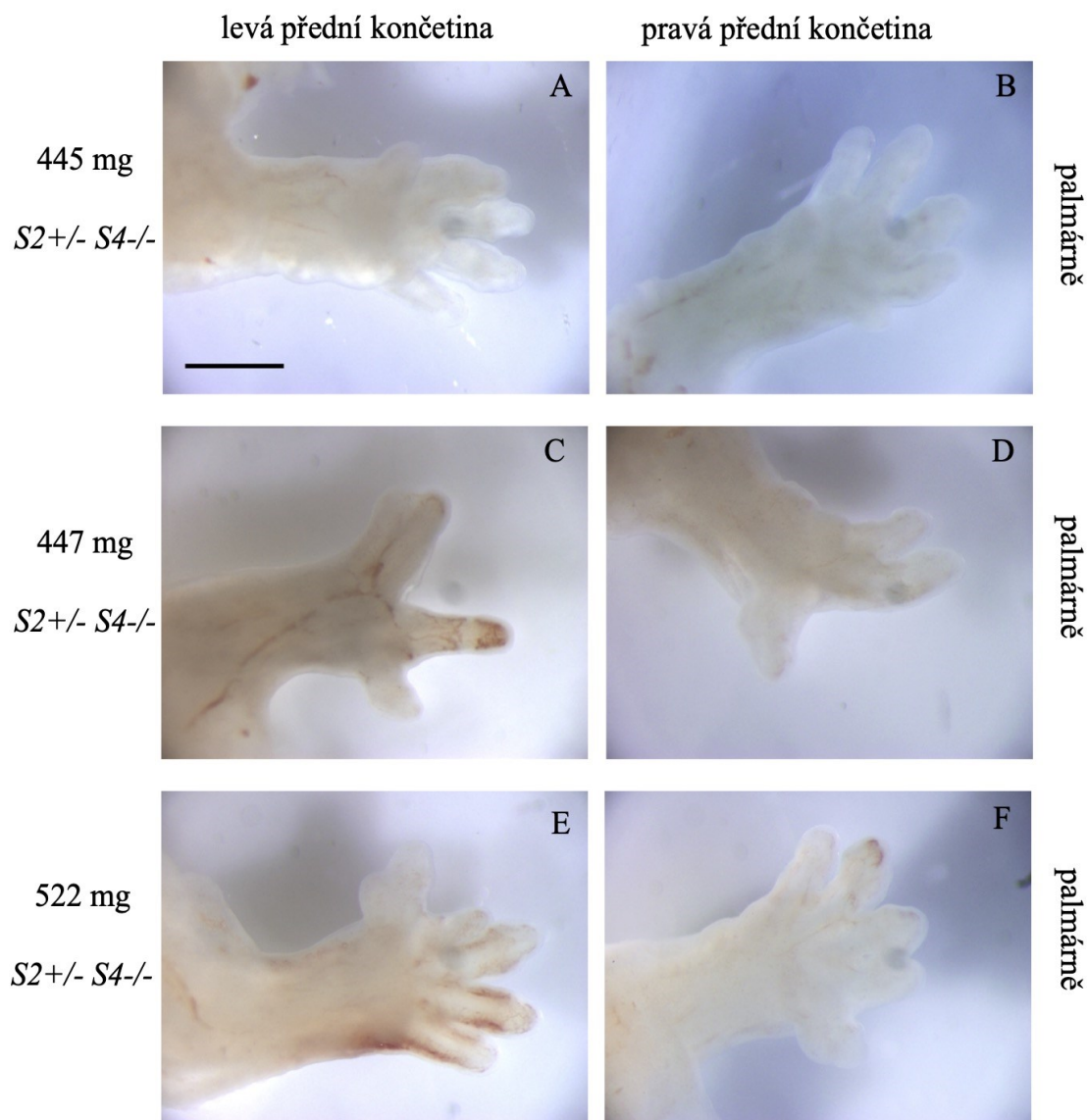
Embryonální stádium 15,5

V embryonálním stádiu 15,5 byla zachycena tři embrya genotypu *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} s patologiemi předních končetin. Bylo taktéž zachyceno jedno embryo s genotypem *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-}, které ale nevykazovalo žádnou patologii končetin.

První jedinec (445 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 40A, B) vykazuje unilaterální patologii na pravé přední končetině. Patologie se projevuje mírnou závažností jako rozštěp v centrální linii (obr. 40B). Levá přední končetina nevykazuje žádnou zjevnou patologii (obr. 40A).

Druhý jedinec (447 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 40C, D) vykazuje závažný fenotypový projev na obou předních končetinách. Autopodium levé přední končetiny je zasaženo rozštěpem ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 2. a 3. prstu a 4. a 5. prstu (obr. 40C). Autopodium pravé přední končetiny jednoznačně vykazuje snížený počet prstů (oligodaktylii), přičemž na radiální straně vznikl rozštěp (obr. 40D).

Třetí jedinec (522 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 40E, F) vykazuje bilaterální patologie předních končetin. Autopodium levé přední končetiny vykazuje nadpočetný prst (polydaktylii) na radiální straně autopodia. Na téže straně vykazují prsty změnu jejich velikosti (zmenšení) oproti prstům na ulnární straně (resp. 3., 4. a 5. prstu). Na palcové straně došlo také syndaktylii prvních dvou prstů (obr. 40E). Autopodium pravé přední končetiny vykazuje syndaktylii 2. a 3. prstu (obr. 40F).



Obrázek 40 **Přední končetiny jedinců v embryonálním stádiu 15,5.** První jedinec (445 mg) vykazuje patologii pouze pravé přední končetiny ve formě rozštěpu ve střední čáře (B). Levá končetina není patologická (A). Druhý jedinec (447 mg) vykazuje závažné patologie obou předních končetin. Na levé končetině je patrný rozštěp ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 2. a 3. prstu a 4. a 5. prstu (C) a na pravé končetině je přítomná oligodaktylie a rozštěp umístěn radiálně (D). Jedinec tři (522 mg) vykazuje bilaterální patologii. Na levém autopodiu jsou patrné změny v oblasti radiální, a to nadpočetný prst, zmenšení velikosti prstů a syndaktylie (E). Pravé autopodium je zasaženo mírně ve formě syndaktylie 2. a 3. prstu (F). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

Embryonální stádium 16,5

V embryonálním stádiu 16,5 bylo zachyceno pouze jedno embryo genotypu *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} s patologií předních končetin.

Tento jedinec (573 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 41A, B) vykazoval závažné defekty obou předních končetin. Autopodium levé přední končetiny bylo zasaženo kombinací vad. Především je opět patrný rozštěp v centrální oblasti autopodia v kombinaci se syndaktylií 2. a 3. prstu a 4. a 5. prstu, přičemž na ulnární straně autopodia došlo i ke zkrácení velikosti prstů, jež lze v kombinaci se syndaktylií nazvat symbrachydaktylií (obr. 41A). Na autopodiu pravé přední končetiny tohoto jedince je taktéž patrný rozštěp ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 2. a 3. prstu (obr. 41B).



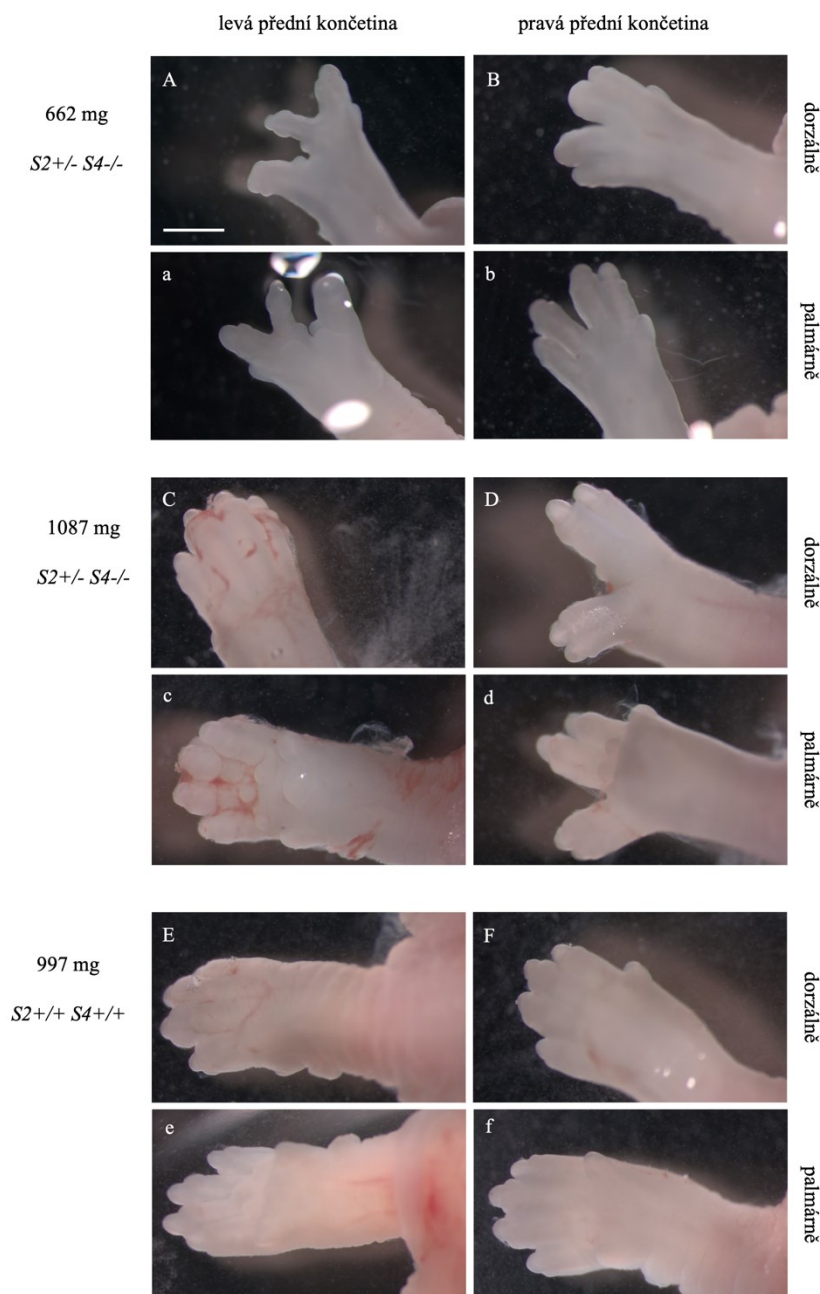
Obrázek 41 Přední končetiny jedinců embryonálního stádia 16,5. Jediný zachycený jedinec (573 mg) v tomto ED má oboustrannou patologii předních končetin. Jeho levé autopodium má kombinované defekty – rozštěp v centrální čáře, syndaktylie 2. a 3. prstu a 4. a 5. prstu, ulnárně jsou prsty zkráceny (A), pravé autopodium je zasažené rozštěpem ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 2. a 3. prstu (B). Na obrázku C a D jsou zobrazeny končetiny kontrolního jedince (666 mg, *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{+/+}). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

Embryonální stádium 17,5

V embryonálním stádiu 17,5 byla zachycena dvě embrya s genotypem *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} s defektním vývojem autopodia předních končetin.

První jedinec (662 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 44A, a, B, b) vykazuje bilaterální patologii. Autopodium levé přední končetiny vykazuje závažný defekt. Došlo k syndaktylii 4. a 5. prstu, a dále se vytvořily dva rozštěpy, a to ve střední čáře autopodia a v oblasti mezi fúzovanými prsty (4. a 5.) a 3. prstem (obr. 42A, a). Autopodium pravé přední končetiny vykazuje rozštěp ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 2. a 3. prstu (obr. 42B, b).

Druhý jedinec (1087 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 42C, c, D, d) vykazuje unilaterální patologii, a to na pravé přední končetině. Na této končetině došlo v oblasti autopodia k rozvinutí rozštěpu ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 2. a 3. a 4. a 5. prstu (obr. 42D, d). Levá přední končetina nevykazuje žádné zjevné defekty autopodia (obr. 42C, c).



Obrázek 42 **Přední končetiny jedinců v embryonálním stádiu 17,5.** První jedinec (662 mg, *Spry2+/- Spry4-/-*) vykazuje bilaterální patologii. Levé autopodium je zasaženo mnohačetnými patologiemi – syndaktylie 4. a 5. prstu, rozštěp ve střední čáře a rozštěp mezi 3. prstem a fúzovanými prsty (A, a). Pravé autopodium vykazuje rozštěp ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 2. a 3. prstu (B, b). Druhé embryo (1087 mg, *Spry2+/- Spry4-/-*) má patologii pouze na pravé přední končetině, a to rozštěp ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 2. a 3. prstu, zároveň i 4. a 5. prstu (D, d). Levá končetina nevykazuje přítomnost patologie (C, c). Třetí jedinec (997 mg, *Spry2+/+ Spry4+/+*) je kontrolní jedinec pro toto embryonální stádium (levá končetina – E, e; pravá končetina – F, f).

Embryonální stádium 18,5

V embryonálním stádiu 18,5 bylo zachyceno pouze jedno embryo genotypu *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, které mělo defektní vývoj autopodia předních končetin.

Tento jedinec (1546 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}, obr. 43A, a, B, b) vykazuje unilaterální patologii, a to pravé přední končetiny, jež se projevuje jako rozštěp ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 3. a 4. prstu (obr. 43B, b). Autopodium levé přední končetiny nevykazuje žádnou zjevnou vadu autopodia (obr. 43A, a).

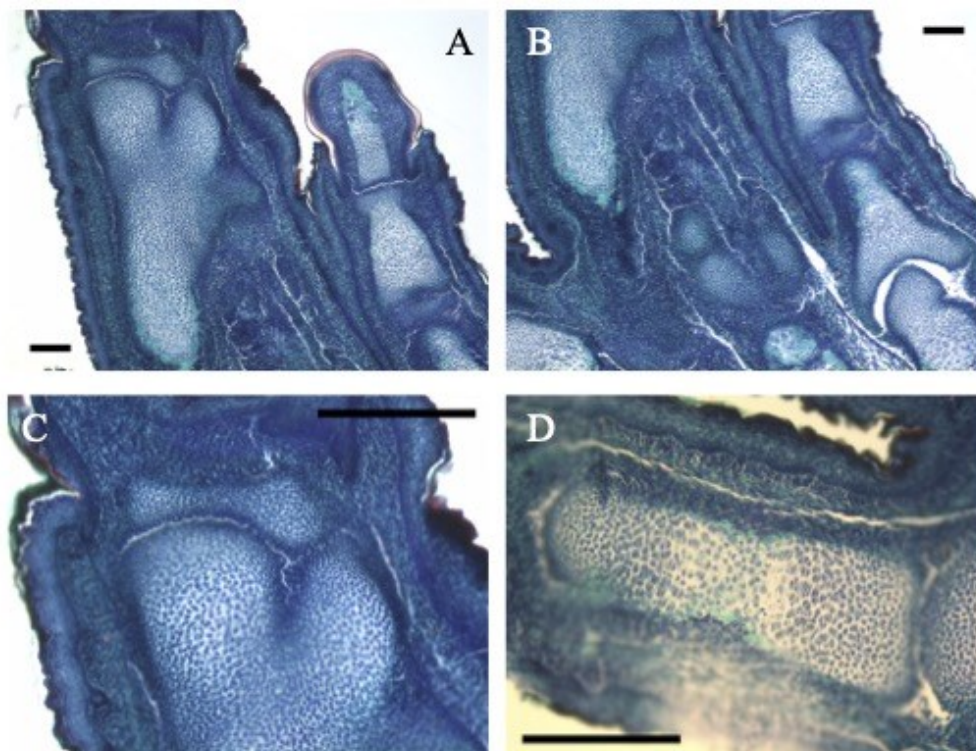


Obrázek 43 **Přední končetiny jedince v embryonálním stádiu 18,5.** Tento jedinec (1546 mg, *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-}) vykazuje unilaterální patologii pravé přední končetiny, jež se projevuje jako rozštěp ve střední čáře v kombinaci se syndaktylií 3. a 4. prstu (B, b). Levá přední končetina je patologii nezasazena (A, a). Měřítko udává vzdálenost 1 mm.

10.2.1 Histologická analýza u prenatalních jedinců

Po zabarvení přehledným histologickým barvením, zeleným Massonovým trichromem se u jedince v ED 18,5 (viz výše) podařilo potvrdit fúzování vznikajících kostí v oblasti prstů, a to konkrétně 3. a 4. prstu (obr. 44A, B, C) na pravém autopodiu. Na obr. 44A je viditelné fúzování mediálních článků prstů v jejich délce, nicméně v distální oblasti tohoto útvaru je zřetelné oddělení (obr. 44C). Na obr. 44B je také zřejmá abnormální tvorba a fúze proximálních článků prstů.

Při porovnání proximálního článku prstu kontrolního jedince (obr. 44D) s fúzovanými články pravé končetiny jedince s patologií, je patrná absence růstové ploténky (obr. 44A, D).



Obrázek 44 **Histologická analýza autopodia pravé přední končetiny jedince genotypu *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} v ED 18,5 (A-C).** Pomocí barvení zeleným trichromem byly zviditelněny struktury obsahující kolagenní vazivo. Byla potvrzena synostóza, resp. syndaktylie, 3. a 4. prstu, jejichž články fúzovaly (A, C). K abnormálnímu vývoji struktury došlo již v oblasti proximálních článků prstů (B). Na obrázku D je zachycen proximální článek prstu kontrolního jedince *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{+/+}. Měřítko udává vzdálenost 0,1 mm.

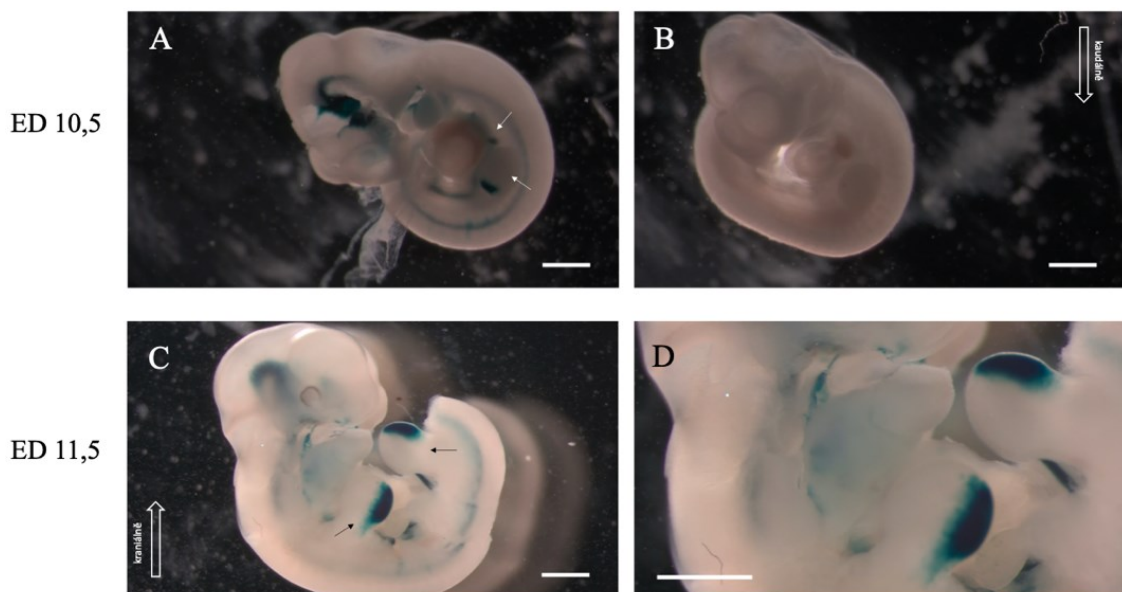
10.3 Sledování populace exprimující *Shh* v ZPA u myši s normálním vývojem končetin

Bylo provedeno zobrazení descendentní populace buněk, které v minulosti exprimovaly *Shh* v posteriorní oblasti autopodia, tedy v oblasti ZPA, na předních i zadních končetinách s pomocí X-galového barvení (viz metodika). Buněčná populace byla detekována jak makroskopicky (obr. 45, obr. 46) tak i mikroskopicky pomocí rutinní histologie (obr. 47, obr. 48). Descendentní oblast obsahující buňky, které v minulosti exprimovaly *Shh* a jejich potomky, byla detekována na končetinových pupenech v embryonálním stádiu 10,5 (obr. 45A, B). Více patrné je zabarvení již v ED 11,5 (obr. 45C,

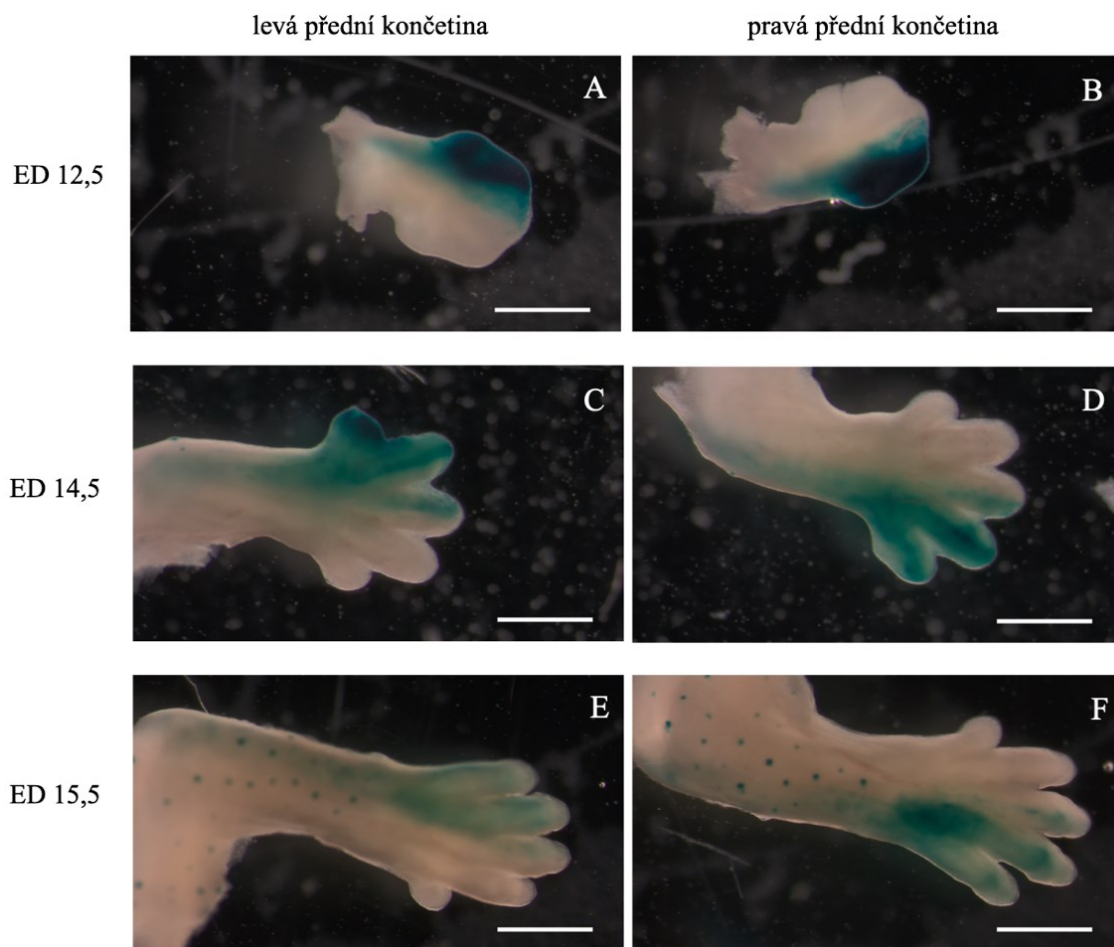
D), které bylo zachyceno také v ED 12,5 (obr. 46A, B, obr. 47A, B), jelikož exprese v ZPA je do ED 12,0 aktivní. Descendentní linii bylo možné detekovat také na ED 14,5 (obr. 46C, D, obr. 48A-C) a 15,5 (obr. 46E, F).

Je patrné, že v ranějších vývojových stádiích (ED 12,5) je zbarvení silnější a více viditelné převážně v oblasti budoucího 4. a 5. prstu (obr. 46A, B, obr. 47A, B), nicméně ve vyšších embryonálních stádiích (ED 14,5 a 15,5), kdy již ZPA *Shh* aktivně neexprimuje, jsou pozitivní buňky stále detekovatelné také ve 3. prstu, resp. jeho ulnární polovině (obr. 46C-F). U ED 14,5 byla pozitivita zachycena taktéž v chondrocytech budoucích kostí (obr. 48A-C).

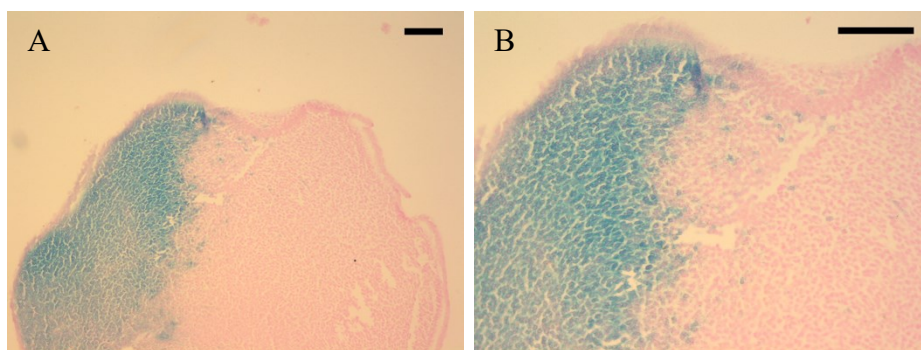
Na ED 15,5 byla descendentní oblast exprese *Shh* pozorována také v oblasti chlupových folikulů na zeugopodiu končetin (obr. 46E, F).



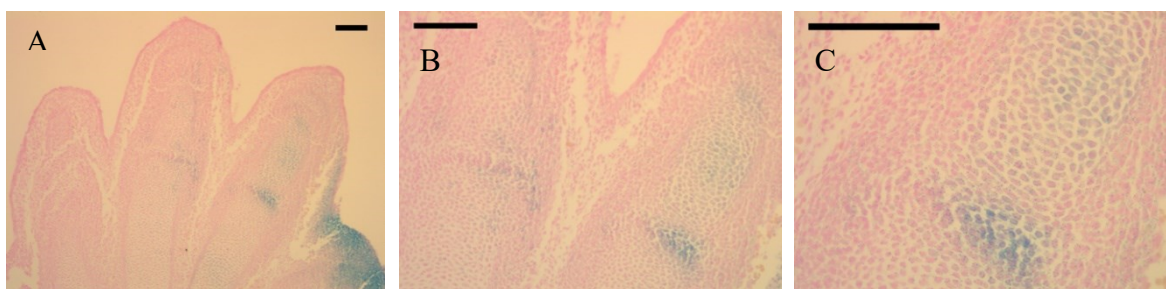
Obrázek 45 Zobrazení descendentní linie buněk exprimující *Shh* u embryonálních stádií 10,5 a 11,5 (A-D). Pozitivně značená descendentní linie buněk v oblasti probíhající a minulé exprese *Shh* pomocí metody Cre-LoxP systému byla pozorována na embryích v ED 10,5 (A) v oblasti vznikajících končetinových pupenů předních a zadních končetin (bílé šipky, A). Pro srovnání je uvedeno negativní embryo (B). Zřetelnější modré zbarvení jak na předních, tak i zadních končetinách je patrné u embryí v ED 11,5 (černé šipky, C). Na obrázku D je zobrazen detail končetin. Měřítko udává vzdálenost 1 mm.



Obrázek 46 Sledování buněčné linie exprimující *Shh* (modře) u předních končetin LacZ pozitivních jedinců v dalších embryonálních stádiích. Zobrazeno dorzálně. V ED 12,5 je posteriorní oblast autopodia jasně zbarvena, vykazuje vyšší intenzitu zbarvení v oblasti budoucího 4. a 5. prstu (A, B). V ED 14,5 je zřetelně viditelné, že jsou pozitivně značené buněčné populace přítomné i v ulnární polovině 3. prstu (C, D), což je patrné i na ED 15,5. Nicméně lze říci, že v tomto ED je ve 3. prstu zbarvení velmi slabé (E, F). Měřítka udávají vzdálenost 1 mm.



Obrázek 47 Autopodium pravé přední končetiny jedince v ED 12,5 (palmárně) se zobrazením descendentní linie buněk exprimující *Shh* od začátku vývoje (modře). Buňky a jejich potomci exprimující *Shh* v minulosti se ve střední oblasti autopodia setkávají s buňkami, které jsou nezabarvené, tedy tyto buňky nejsou potomky ZPA a v minulosti se tato buněčná linie na expresi *Shh* nepodílela. Měřítko udává vzdálenost 0,1 mm.



Obrázek 48 Autopodium levé přední končetiny jedince v ED 14,5 (palmárně) se zobrazením descendentní linie buněk exprimující *Shh* od začátku vývoje (modře). Pozitivita je detekovatelná mimo jiné v chondrocytech formujících se kostí (B, C). Měřítko udává vzdálenost 0,1 mm.

11 Diskuse

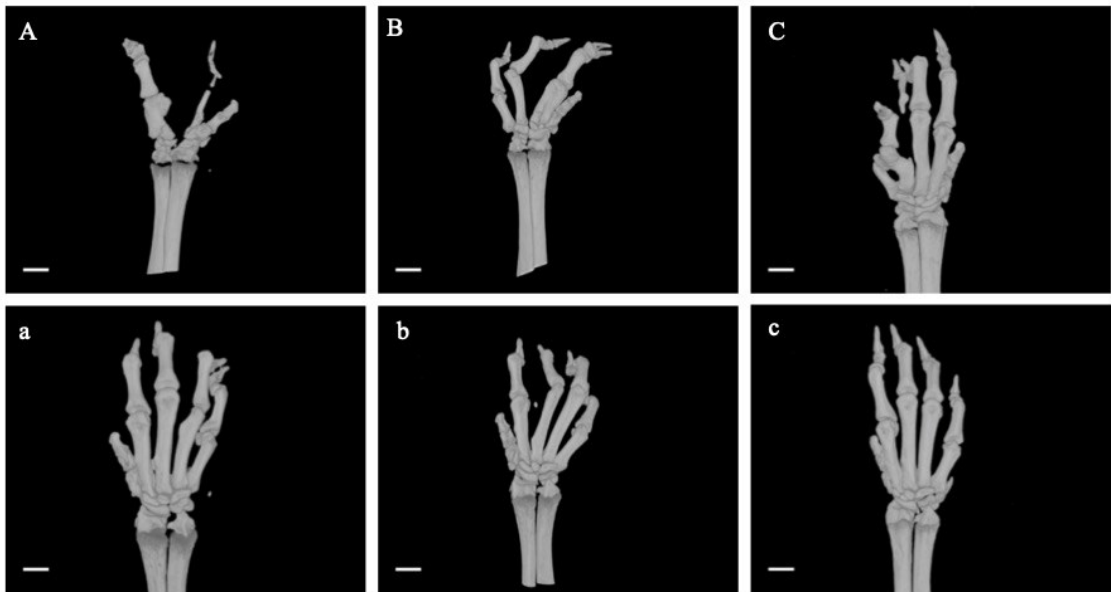
Na základě našich získaných výsledků bylo potvrzeno, že u *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} a *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-} myších jedinců dochází k narušenému vývoji autopodia předních končetin. Patologie se projevovaly převážně v mediální oblasti autopodia, a to jako rozštěp v kombinaci se syndaktylií, přičemž vznikala tzv. klepetovitá ruka neboli ektrodaktylie. Porucha vývoje ve střední části končetiny byla zachycena již od ED 12,5 (obr. 36), kdy bylo možné na vyvíjejícím se autopodiu v jeho distální oblasti pozorovat rýhu nebo zářez. Tento zářez se prohluboval u pokročilejších stádií až nakonec vedl ke vzniku hlubokého rozštěpu, který byl detekován i u postnatálních jedinců.

Dalšími vadami pozorovanými v kombinaci s ektrodaktylií nebo bez přidruženého rozštěpu byly změny v počtu prstů, a to jak polydaktylie (obr. 37C, H; obr. 39E; obr. 40E), tak i oligodaktylie (obr. 23A, obr. 25A, obr. 27A, obr. 39A), dále změny ve tvaru prstů (např. drápkovité ohnutí – kamptodaktylie; obr. 19A, obr. 33A) a velikosti prstů (obr. 22A, obr. 30A, obr. 40E). U jednoho z postnatálních jedinců byla spolu se změnou velikosti prstu zaznamenána absence ochlupení a drápu bilaterálně (obr. 22A, B). Ve všech částech skeletu autopodia docházelo také k četným synostózám (srůstaly karpální kosti – např. patrné na obr. 16a, c, obr. 19a, c, obr. 30a, b, dále srůstaly metakarpální kosti – např. na obr. 16a, c, obr. 19a, c, obr. 25 a, c, obr. 30a, b, nebo články prstů – obr. 16a, c, obr. 19a, c, obr. 25a, c, obr. 27a, b). Relativně časté byly změny sezamských kostí, které buď zcela chyběly nebo fúzovaly s další kostí (obr. 16b, obr. 19b, obr. 33a). Na základě výsledků metody projasňování tkáně a barvení kostěné a chrupavčité tkáně lze říci, že skelet postnatálních jedinců stejného věku postižených patologií vykazoval rozdílnou pokročilost osifikace. Stejně staří jedinci vykazovali různý stupeň kostní zralosti a různý stav osifikace kostí, pro porovnání např. jedinci obr. 18 a obr. 21.

Celkově lze říci, že fenotypový projev patogeneze předních končetin je u jednotlivých jedinců s deficiencí *Sprouty2* a/nebo *Sprouty4* proteinů velmi variabilní, a taktéž je rozdílná i závažnost projevu. V souladu s tímto zjištěním lze konstatovat, že variabilita fenotypového projevu byla u *Sprouty2* a/nebo *Sprouty4* myší vysoká i v jiných případech zaznamenaných patologií, což bylo dáno do souvislosti právě s mikrociliární podstatou patogeneze u těchto myší (Hruba *et al.*, 2021).

Zajímavé je, že u postnatálních jedinců byly vady zachyceny v případě unilaterálního fenotypu pouze na levých předních končetinách, a pokud se jedná o jedince s bilaterálním projevem, jsou patologie závažnější na levém autopodiu přední končetiny v porovnání s

pravou stranou (obr. 49). Je známo, že embryo se vyvíjí s levo-pravou asymetrií, a že u orgánů, které jsou považovány za symetricky se vyvíjející, jako je levá a pravá končetina, mohou existovat jemné rozdíly v molekulární regulaci (Levin, 2005), což následně může způsobit odchylky při vzniku patologií. Některá lidská onemocnění horních končetin, jako je např. Holt-Oramův syndrom, se rovněž projevují asymetricky, a to pouze na levé horní končetině (Newbury-Ecob *et al.*, 1996).



Obrázek 49 Porovnání závažnosti projevu patologie mezi levými (A, B, C) a pravými (a, b, c) předními končetinami tří jedinců. Zobrazeno pomocí uCT skenů skeletu (dorzálně). Je zřejmé, že levé končetiny vykazují vyšší míru závažnosti postižení autopodia než na pravých končetinách. U prvního (A, a) a druhého (B, b) jedince se jedná o bilaterální patologii, avšak je na první pohled patrné, že levé končetiny těchto jedinců jsou výrazněji zasaženy kombinací patologií. Třetí jedinec (C, c) má pouze unilaterální patologii na levé přední končetině, přičemž pravá končetina (c) je považována za normálně vypadající. Měřítka udává vzdálenost 1 mm.

Utváření levo-pravé asymetrie embrya probíhá již v raném vývoji člověka a na tomto ději se podílí značné množství endogenních vývojových molekul. Buňky primitivního proužku a uzlu exprimují *FGF8*, který indukuje expresi *Nodal* v levé polovině embrya (Boettger *et al.*, 1999). Taktéž dochází k expresi genu *Lefty*, který je exprimován v levé polovině embrya (Meno *et al.*, 1996). *Lefty-1* exprimován v levé části neurální ploténky, a omezuje expresi *Lefty-2* a *Nodal* na levou stranu embrya (Meno *et al.*, 1998). Bylo zjištěno, že stanovení levo-pravé asymetrie u myšičích embryí je dosaženo levostranným prouděním tekutiny v dutině primitivního uzlíku, které je generováno pravotočivým pohybem 200–300 řasinek v uzlíku (Shinohara *et al.*, 2012).

V rámci patogeneze není pravo-levá odlišnost s levostrannou predominancí ve frekvenci výskytu patologií zjištěná v rámci naší studie u předních končetin zcela ojedinělým jevem. Například rozštěpy rtu a patra, které jsou v 80 % případů unilaterální, se až dvakrát častěji vyskytují na levé straně (Genisca *et al.*, 2009). Prozatím nebyla zjištěna příčina tohoto jevu, nicméně i v naší studii se rozštěpy autopodia vyskytují u postnatálních jedinců výhradně na levé končetině a u prenatalních jedinců bylo zachyceno taktéž více případů levostranného rozštěpu končetiny. Vzhledem k zapojení primárních cílů ve vývoji končetin (Haycraft *et al.*, 2005) by příčinou těchto defektů mohlo být narušení struktury a funkce, případně úplná ztráta primárních cílů u jedinců s deficiencí *Spry2* a/nebo *Spry4*.

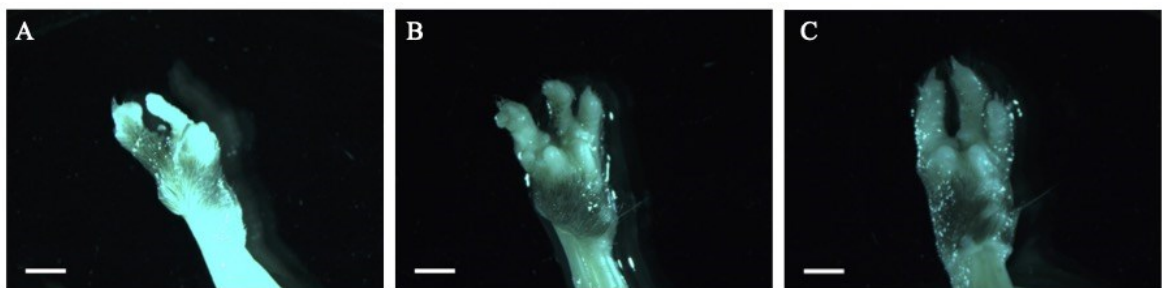
Již dříve bylo popsáno, že transgenní myši s deficiencí proteinů rodiny Sprouty vykazují abnormality dlouhých kostí, a to včetně dosažení menších délek dlouhých kostí projevující se podobně jako achondroplazie (Joo *et al.*, 2016). Prokázalo se, že *Spry2* je podstatný pro normální vývoj a diferenciaci chondrocytů a je významným regulátorem enchondrální osifikace. U *Spry2* deficientních myší byla zaznamenána porucha chondrogenese v dlouhých kostech související s chondrocyty v růstové ploténce, nicméně přesný mechanismus, kterým by se *Spry2* mohl podílet na vzniku chondrodysplastických syndromů, není znám (Joo *et al.*, 2016). I v naší studii byly tělesné rozměry jedinců *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} menší ve srovnání s WT zvířaty (obr. 14), což je v souladu s recentně publikovanými daty (Hruba *et al.*, 2021). V prenatalní růstové ploténce embryonálního stádia 18 byla prokázána přítomnost *Spry2* v osteogenních buňkách (osteoblastech, osteocytech a osteoklastech), a právě deficeence *Spry2* by mohla být jednou z příčin růstové retardace prostřednictvím abnormalní funkce osteoblastů a osteocytů (Vesela *et al.*, 2019). *Spry2* protein se nicméně podílí na vývoji končetin i v raných vývojových stádiích a účastní se formování prstů končetin. V ED 10,5 je gen *Spry2* exprimován v AER končetinového pupene (Minowada *et al.*, 1999). Nejdříve je jeho exprese detekovatelná v centrální oblasti (ED 11,5), později se rozšiřuje do oblasti budoucích prstů a v ED 12,5 a 13,5 již jasně obklopuje články prstů (Diplomová práce Pasovská, 2019).

Spry4 je exprimován v růstové zóně končetinového pupene v mezenchymu pod AER a ve spojitosti s deficiencí *Spry4* u myší byly rovněž zaznamenány defekty autopodia předních končetin, a to především ve formě polysyndaktylií. Častým fenotypovým projevem byly také fúze a duplikace prstů na předních končetinách (Taniguchi *et al.*, 2007). V našem případě lze říci, že při kombinaci deficeence *Spry2* a *Spry4* proteinů byly zachyceny převážně rozštěpy autopodia ve střední čáře, ale frekventované byly rovněž syndaktylie a

četné synostózy v oblasti karpálních, metakarpálních kostí a článků prstů. Rozdíly v projevu patologií u jedinců s genotypy *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} a *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-} nelze na základě nasbíraného materiálu stanovit, jelikož fenotypový projev se u těchto jedinců překrývá a zásadně se neodlišuje. Navíc celkově bylo zachyceno podstatně méně jedinců *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-} a ne u všech došlo k viditelnému rozvoji patologie. Je zřejmé, že protein *Spry4* hraje podstatnou roli během rozvoje končetin, ale má taktéž úlohu v rozvoji dalších tkání a orgánů (Zhang *et al.*, 2001), jejichž defekty mohou být při úplné absenci tohoto proteinu s životem embrya neslučitelné a může docházet k potratu embrya během embryonálního vývoje (Taniguchi *et al.*, 2007), což by mohlo být pravděpodobnou příčinou nízkého zachytu jedinců s tímto genotypem v naší studii.

Zdá se, že delece obou alel *Spry4* genu by mohla hrát významnější roli ve vývoji patologií předních končetin, nebo by se mohly uplatňovat další faktory, jako jsou epigenetické změny genové exprese. V posledních letech bylo prokázáno, že epigenetické faktory se podílí na regulaci tvorby kosti a mohou významně ovlivnit diferenciaci osteoblastů a osteoklastů (Teven *et al.*, 2011; Letarouilly *et al.*, 2019). Bylo také popsáno, že *Spry4* podléhá epigenetickým histonovým modifikacím u *Xenopus tropicalis* v končetině (Hayashi *et al.*, 2015). V souvislosti s epigenetickým umlčením a mutací „*loss of function*“ genu *Spry4* v progenitorových buňkách bylo zjištěno, že by tyto změny mohly vést dokonce ke karcinogenezi (Katoh & Katoh, 2006).

V rámci naší postnatální studie byly zachyceni čtyři jedinci s rozštěpem autopodia, přičemž tři z nich byli samci (obr. 50). I když relativně nízký počet zachycených patologií nám zatím nedovoluje přesnější statistickou analýzu, je z tohoto hlediska zajímavé, že i u člověka se ektrodaktylie častěji projevuje u mužů než u žen (Tatwade & Hiwarkar, 2019). Nicméně naše výsledky nepotvrzují fakt, že se ektrodaktylie vyskytuje častěji bilaterálně než unilaterálně (Tatwade & Hiwarkar, 2019). Námi získané výsledky z prenatální i postnatální



Obrázek 50 Rozštěp ve střední linii levého autopodia 3 myších samců (A-C). Zobrazeno palmárně. Měřítka udává vzdálenost 1 mm.

studie vykazují opačný trend, tedy že s vyšší četností byly zachyceny unilaterální rozštěpy (převážně levostranné – u 4 postnatálních a 5 prenatalních jedinců a pravostranné – u 3 prenatalních jedinců) než bilaterální rozštěpy (celkově u 4 prenatalních jedinců).

Zajímavé rovněž je, že v naší studii všichni jedinci s genotypem *Spry2*^{+/-} *S4*^{-/-} vykazovali v prenatalním období (ED 12,5-18,5) alespoň unilaterálně patologie autopodia končetin, zatímco postnatálně frekvence výskytu patologií u tohoto genotypu nebyla 100%. Vzhledem k nízkým počtům jedinců s požadovaným genotypem obecně není zatím možné provést statisticky relevantní analýzu, ale zdá se, že zde mohou hrát roli určité mechanismy reparace ve smyslu regenerace patologicky se vyvíjejících struktur, a ne všechny prenatalní vady autopodia se nakonec prezentují v postnatálním období.

Předpokládá se, že změny genové exprese v ektodermu i mezodermu se podílí na vzniku ektrodaktylie předních končetin u myší. Změny v AER nastávají relativně brzy v časovém kontextu dalších vývojových událostí, jsou tyto změny považovány za iniciační faktor vzniku patologie (Shimizu *et al.*, 2007). Ektrodaktylie může vznikat narušením pozitivní zpětné vazby mezi AER a ZPA (Chrisman *et al.*, 2004). Zajímavá je informace popsaná v práci autorů Bell *et al.* (2005), že embrya zasažena postaxiální ektrodaktylií předních končetin mají sníženou signalizaci *Shh*. Signalizace byla dostačující pro upregulaci dalších procesů potřebných pro polarizační aktivitu, nicméně byla nedostatečná pro specifikaci programované buněčné smrti v mezenchymových buňkách předních končetin. To by mohlo vysvětlovat ektrodaktylii v kombinaci se syndaktylií, která byla zachycena i u jedinců v této práci.

Na tvorbě končetin se podílejí *Shh* a FGF signalizační dráhy, jež se navzájem ovlivňují prostřednictvím zpětnovazebných smyček. *Spry2/Spry4* fungují jako antagonisté FGF signalizace, čímž nepřímo ovlivňují i hladiny *Shh*. U *Spry2/Spry4* mutantních myší vede ztráta funkce genů ke zvýšení FGF signalizace (Klein *et al.*, 2006). Fenotypovým projevem jsou tato zvířata srovnatelná s projevem patologií u myší s narušenou FGF signalizací (Shazeeb *et al.*, 2018). U *Spry2* deficientních myší bylo popsáno, že *Shh* signalizace je u těchto jedinců ovlivňována prostřednictvím FGF signalizační dráhy (Lochovska *et al.*, 2015). Celkově byla deficiencie *Spry2* a/nebo *Spry4* dávana do souvislosti s prodloužením *Shh* exprese (Lochovská *et al.*, 2015, Hrubá *et al.*, 2021), což by i v našem případě mohlo vysvětlit narušení vývoje autopodia v závislosti na patologické expresi *Shh*

v ZPA. Narušení vývoje se projevuje ve střední linii autopodia již od ED 12,5. Střední linie autopodia je zóna, kde na základě našich zjištění z provedených Cre-loxP experimentů dochází k limitaci populace buněk, které v minulosti exprimovaly *Shh*, a to právě v ZPA (obr. 45, obr. 46). V pozdějších vývojových stádiích jsme zachytili přítomnost descendentních buněk, které v minulosti exprimovaly *Shh* v chondrocytech budoucích kostí autopodia (obr. 48).

Nepostradatelnou součástí mnoha vývojových procesů jsou primární řasinky, které se podílejí na vývoji a funkci tkání a orgánů a během vývoje embrya řídí určení jeho levo-pravé laterality. Primární cilie jsou přítomny v chondrocytech, jsou podstatné pro normální diferenciaci osteoblastů, pro funkci osteocytů a uplatňují se při vývoji kostí (Yuan *et al.*, 2015). U mutantních myší *Spry2*^{-/-} a *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} byly zaznamenány abnormálně prodloužené cilie v chondrocytech embryonálních i postnatálních růstových plotének (Hruba *et al.*, 2021). Pro funkčnost a strukturu primárních řasinek jsou podstatné tzv. IFT komplexy, jež zprostředkovávají transport (Kozminski *et al.*, 1993). Pokud dojde k narušení některé z podjednotek komplexu, může dojít k narušení funkce nebo úplné ztrátě primárních cilií. IFT a ciliární proteiny také regulují diferenciaci chondrocytů. Bylo popsáno, že jejich delece má za následek postnatální dwarfismus, narušení diferenciaci chondrocytů, resorpce a diferenciaci chrupavky (Song *et al.*, 2007; Coveney *et al.*, 2022). Z tohoto hlediska by v dalším výzkumu bylo vhodné se dále zabývat právě hodnocením diferenciaci chondrocytů a formace chrupavky a její přestavby na kost v procesu osifikace u *Spry2/Spry4* deficientních myší.

Mimo jiné bylo také zjištěno, že primární řasinky jsou nepostradatelnými regulátory vývojových signalizačních drah, jako je Hedgehog nebo FGF dráha (Huangfu *et al.*, 2003; Neugebauer, *et al.*, 2009). Bylo rovněž prokázáno, že změny délky cilií zprostředkované FGF korelují se změnami Hedgehog odpovědí (Kunova Bosakova *et al.*, 2018).

Narušení funkce či struktury primárních cilií může vyústit v rozvoj vrozených onemocnění, které mají podobné fenotypové projevy, a jsou souhrnně označovány jako ciliopatie. Jako ciliopatické byly označeny také skeletální dysplazie, jež mají za následek mimo jiné i zkrácení končetin a polydaktylii, jež je častým fenotypovým projevem lidských ciliopatií. Významné zkrácení primárních řasinek bylo zaznamenáno v růstových chrupavkách jedinců postižených achondroplazií a thanatoforickou dysplazií, které jsou

následkem konstitutivní signalizace FGFR3 (Wilcox *et al.*, 1998). Na základě toho je možné obě onemocnění zařadit mezi ciliopatie.

U mutantních myší *Spry2*^{-/-} a také *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} byla zjištěna zvýšená míra Hedgehog signalizace závislá na ciliích. Patologie popsané recentně u myší s deficiencí *Spry2*, představují fenotypové projevy, které jsou součástí ciliopatií (Hruba *et al.*, 2021). *Spry2* deficientní postnatální myši vykazují malý vzrůst daný zkrácením dlouhých kostí a snížením množství trabekulární kostní hmoty, ale například i rozštěpy patra, což připomíná jiné skeletální ciliopatie (Hruba *et al.*, 2021). Ve spojitosti se ztrátou *Spry2/Spry4* genů bylo také zaznamenáno mnoho dalších defektů, mezi něž se řadí i narušení enchondrálního formování kostí, tvorby prstů a dalších, které mohou být rovněž označeny jako ciliopatické.

V této práci se nám podařilo zjistit a popsat anatomicko-morfologické odchylky autopodia předních končetin u transgenních myší *Spry2*^{+/-} *Spry4*^{-/-} a *Spry2*^{+/+} *Spry4*^{-/-} a to u dospělců i v průběhu vývoje. Patologie byly zachyceny na obou předních končetinách myší s delecí *Spry2* a/nebo *Spry4* genů jak prenatalně, tak postnatálně. Defekty autopodia předních končetin jsou viditelné od embryonálního stádia 12,5, kde je již zřetelný rozvoj patologie. Je patrné, že defekty jsou velmi variabilní a taktéž vykazují rozdílnou míru závažnosti. Mezi nejčastější patřili např. rozštěp přední končetiny ve střední linii autopodia, syndaktylie a synostóza kostí. U prenatalních i postnatálních jedinců byly vady častěji zachyceny unilaterálně, přičemž častější byly vady na levé přední končetině nebo v případě postnatálních jedinců s bilaterální patologií měly patologie na levé končetině závažnější projev než na pravé straně.

Tato studie přinesla také několik dalších otázek. V budoucnu by bylo potřeba se věnovat především molekulární analýze raného vývoje předních končetin prenatalních jedinců s delecí *Spry2* a/nebo *Spry4* genů se zaměřením na ZPA. Výzkum by mohl být rovněž zaměřen na proliferaci buněk a apoptózu v končetinovém pupenu. Z hlediska přítomnosti Shh descendentních populací buněk v chrupavkách v oblasti autopodia by rovněž bylo vhodné zaměřit se na analýzu chondrocytů a osifikace. Z hlediska nižšího zachytu patologií v populaci dospělých myší *Spry2*^{+/-} *S4*^{-/-} než v prenatalních stádiích by bylo zajímavé zabývat se možnostmi vývojových reparačních mechanismů u různých typů postižení těchto jedinců. Pozornost by měla být taktéž věnována detekci primárních cilií ve vznikajících končetinách myší u nižších vývojových stádií (ED 9,5-11,5), tedy v období aktivity ZPA, jejíž buňky exprimují gen *Shh*.

12 Závěry

Na základě předložených výsledků je možné vyvodit tyto závěry studie:

1. U myší s genotypem *Sprouty2*^{+/-} *Sprouty4*^{-/-} a *Sprouty2*^{+/+} *Sprouty4*^{-/-} byly zaznamenány patologie v oblasti autopodia, které mají značně variabilní projev i závažnost. Nejpočetnější skupinou zaznamenaných vad jsou defekty mediální oblasti autopodia zahrnující rozštěpy, dále se objevují syndaktylie, synostózy ve všech částech autopodia, změny počtu prstů (oligodaktylie i polydaktylie) i změny ve tvaru a velikosti jednotlivých prstů.

U postnatálních jedinců se patologie objevují častěji na levé přední končetině. Na levé přední končetině byly rovněž pozorovány vady závažnější ve srovnání s pravou končetinou.

2. Longitudinální analýza v průběhu embryogeneze ukázala, že patologický vývoj končetin byl viditelný od ED 12,5. Od tohoto prenatálního stádia vykazovali všichni zachycení jedinci genotypu *Sprouty2*^{+/-} *Sprouty4*^{-/-} vadu autopodia alespoň unilaterálně.

V prenatálním období byly nejčastěji zachyceny vady oboustranné, poté pravostranné a nakonec levostranné.

13 Použitá literatura

- AHMAD, M., H.ABBAS, S. HAQUE a G. FLATZ. X-Chromosomally inherited split-hand/split-foot anomaly in a Pakistani kindred. *Human Genetics*. 1987, 75(2), 169-173.
- AL-QATTAN, M. M. Classification of hand anomalies in Poland's syndrome. *British Journal of Plastic Surgery*. 2001, 54(2), 132-136.
- ASHE, A., N. C. BUTTERFIELD, L.TOWN, A. D. COURTNEY, A. N. COOPER, C. FERGUSON, R. BARRY, F. OLSSON, K. F. LIEM, R. G. PARTON, B. J. WAINWRIGHT, K. V. ANDERSON, E. WHITELAW, C. WICKING. Mutations in mouse Ift144 model the craniofacial, limb and rib defects in skeletal ciliopathies. *Human Molecular Genetics*. 2012, 21(8), 1808-1823.
- BABA, A. N., Y. J. BHAT, S. M. AHMED a A. NAZIR. Unilateral cleft hand with cleft foot. *International journal of health sciences*. 2009, 3(2), 243–246.
- BAKER, K.M., D. S. OLSON, C. O. HARDING a R. M. PAULI. Long-term survival in typical thanatophoric dysplasia type 1. *American Journal of Medical Genetics*. 1997, 70(4), 427-436.
- BALDOCK, R., J. BARD, D. DAVIDSON a G. MORRIS-KAY. Kaufman's Atlas of Mouse Development Supplement: With Coronal Sections. Elsevier, 2015. ISBN 978-0128000434.
- BANGS, F. a K. V. ANDERSON. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2017, 9(5). *
- BEALES, P. L., E. BLAND, J. L. TOBIN, C. BACCHELLI, B. TUYSUZ, J. HILL, S. RIX, C. G. PEARSON, M. KAI, J. HARTLEY, C. JOHNSON, M. IRVING, N. ELCIOGLU, M. WINEY, M. TADA a P. J. SCAMBLER. IFT80, which encodes a conserved intraflagellar transport protein, is mutated in Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Nature Genetics*. 2007, 39(6), 727-729.
- BELL, S. M., C. M. SCHREINER, J. A. GOETZ, D. J. ROBBINS a W. J. SCOTT. Shh signaling in limb bud ectoderm: Potential role in teratogen-induced postaxial ectrodactyly. *Developmental Dynamics*. 2005, 233(2), 313-325.
- BELLUS, G. A., HEFFERON, T. W., ORTIZ DE LUNA, R. I., HECHT, J. T., HORTON, W. A., MACHADO, M., KAITILA, I., MCINTOSH, I. a FRANCOMANO, C. A. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *American journal of human genetics*. 1995, 56(2), 368–373.
- BOETTGER, T., L. WITTLER a M.KESSEL. FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Current Biology*. 1999, 9(5), 277-280.
- BOLES, R. G., B. R. POBER, L. H. GIBSON, C. R. WILLIS, J. MCGRATH, D. J. ROBERTS a T. L. YANG-FENG. Deletion of chromosome 2q24-q31 causes characteristic digital anomalies: Case report and review. *American Journal of Medical Genetics*. 1995, 55(2), 155-160.
- BREDRUP, C., S. SAUNIER, M. OUD MACHTELD, T. FISKERSTRAND, A. HOISCHEN, D. BRACKMAN, S. M. LEH., M. MIDTBØ, E. FILHOL, C. BOLEFEYSOT, P. NITSCHKÉ, C. GILISSEN, O. H. HAUGEN, J. S. F. SANDERS, I.

- STOLTE-DIJKSTRA, D. A. MANS, E. J. STEENBERGEN, B. C. J. HAMEL, M. MATIGNON, R. PFUNDT, C. JEANPIERRE, H. BOMAN, E. RØDAHL, J. A. VELTMAN, P. M. KNAPPSKOG, N. V. A. M. KNOERS, R. ROEPMAN, H. H. ARTS. Ciliopathies with Skeletal Anomalies and Renal Insufficiency due to Mutations in the IFT-A Gene WDR19. *The American Journal of Human Genetics*. 2011, 89(5), 634-643.
- BRINER, J., A. GIEDION a M. A. SPYCHER. Variation of Quantitative and Qualitative Changes of Enchondral Ossification in Heterozygous Achondroplasia. *Pathology - Research and Practice*. 1991, 187(2-3), 271-278.
- BURGESS, W. H. a T. MACIAG. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 1989, 58(1), 575-602.
- BURKE, D., D. WILKES, T. L. BLUNDELL a S. MALCOLM. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. *Trends in Biochemical Sciences*. 1998, 23(2), 59-62.
- BÜSCHER, D., B. BOSSE, J. HEYMER a U. RÜTHER. Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development. *Mechanisms of Development*. 1997, 62(2), 175-182.
- BUSS, P. W. Cleft hand/foot: clinical and developmental aspects. *Journal of Medical Genetics*. 1994, 31(9), 726-730.
- CARROLL, R.S., A. L. DUKER, A. J. SCHELHAAS, M. E. LITTLE, E. G. MILLER a M. B. BOBER. Should We Stop Calling Thanatophoric Dysplasia a Lethal Condition? A Case Report of a Long-Term Survivor. *Palliative Medicine Reports*. 2020, 1(1), 32-39.
- CASCI, T., J. VINÓS a M. FREEMAN. Sprouty, an Intracellular Inhibitor of Ras Signaling. *Cell*. 1999, 96(5), 655-665.
- CELLI, U., P. DUIJF, B. C. J. HAMEL, M. BAMSHAD, B. KRAMER, A. P. T. SMITS, R. NEWBURY-ECOB, R. C. M. HENNEKAM, G. VAN BUGGENHOUT, A. VAN HAERINGEN, C. G. WOODS, A. J. VAN ESSEN, R. DE WAAL, G. VRIEND, D. A. HABER, A. YANG, F. MCKEON, H. G. BRUNNER a H. VAN BOKHOVEN. Heterozygous Germline Mutations in the p53 Homolog p63 Are the Cause of EEC Syndrome. *Cell*. 1999, 99(2), 143-153.
- COVENEY, C. R., H. J. SAMVELYAN, J. MIOTLA-ZAREBSKA, J. CARNEGIE, E. CHANG, C. J. CORRIN, T. COVENEY, B. STOTT, I. PARISI, C. DUARTE, T. L. VINCENT, K. A. STAINES, A. K. T. WAN. Ciliary IFT88 protects coordinated adolescent growth plate ossification from disruptive physiological mechanical forces. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2022.
- ČIHÁK, R. Anatomie. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011.
- DAVIDSON, D., A. BLANC, D. FILION, H. WANG, P. PLUT, G.PFEFFER, M. D. BUSCHMANN a J. E. HENDERSON. Fibroblast Growth Factor (FGF) 18 Signals through FGF Receptor 3 to Promote Chondrogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280(21), 20509-20515.
- DAVIS, E. E., Q. ZHANG, Q. LIU, B. H. DIPLAS, L. M. DAVEY, J. HARTLEY, C. STOETZEL, K. SZYMANSKA, G. RAMASWAMI, C. V. LOGAN, D. M. MUZNY, A. C. YOUNG, D. A. WHEELER, P. CRUZ, M. MORGAN, L. R. LEWIS, P. CHERUKURI, B. MASKERI, N. F. HANSEN, J. C. MULLIKIN, R. W. BLAKESLEY, G. C. BOUFFARD, G. GYAPAY, S. RIEGER, B. TÖNSHOFF, I. KERN, N. A.

- SOLIMAN, T. J. NEUHAUS, K. J. SWOBODA, H. KAYSERILI, T. E. GALLAGHER, R. A. LEWIS, C. BERGMANN, E. A. OTTO, S. SAUNIER, P. J. SCAMBLER, P. L. BEALES, J. G. GLEESON, E. R. MAHER, T. ATTÍE-BITACH, H. DOLLFUS, C. A. JOHNSON, E. D. GREEN, R. A. GIBBS, F. HILDEBRANDT, E. A. PIERCE A N. KATSANIS. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nature genetics*. 2011, 43(3), 189–196.
- DE MAXIMY, A. A., Y. NAKATAKE, S. MONCADA, N. ITOH, J. P. THIERY a S. BELLUSCI. Cloning and expression pattern of a mouse homologue of *Drosophila* sprouty in the mouse embryo. *Mechanisms of Development*. 1999, 81(1-2), 213-216.
- DENG, C., A. WYNshaw-BORIS, F. ZHOU, A. KUO a P. LEDER. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is a Negative Regulator of Bone Growth. *Cell*. 1996, 84(6), 911-921.
- DENG, C., M. BEDFORD, C. LI, X. XU, X. YANG, J. DUNMORE a P. LEDER. Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR-1) Is Essential for Normal Neural Tube and Limb Development. *Developmental Biology*. 1997, 185(1), 42-54.
- DUIJF, P. H. G., H. VAN BOKHOVEN a H. G. BRUNNER. Pathogenesis of split-hand/split-foot malformation. *Human Molecular Genetics*. 2003, 12(1), 51-60. *
- DUNGL, P. Ortopedie. Druhé, přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2014.
- DY, C. J., I. SWARUP a A. DALUISKI. Embryology, diagnosis, and evaluation of congenital hand anomalies. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. 2014, 7(1), 60-67.
- EKBLÖM, A. G., T. LAURELL a M. ARNER. Epidemiology of Congenital Upper Limb Anomalies in 562 Children Born in 1997 to 2007: A Total Population Study from Stockholm, Sweden. *The Journal of Hand Surgery*. 2010, 35(11), 1742-1754.
- FAIYAZ UL HAQUE, M., S. UHLHAAS, M. KNAPP, H. SCHÜLER, W. FRIEDL, M. AHMAD a P. PROPPING. Mapping of the gene for X-chromosomal split-hand/split-foot anomaly to Xq26-q26.1. *Human Genetics*. 1993, 91(1), 17-19.
- FALLON, J. F. a R. O. KELLEY. Ultrastructural analysis of the apical ectodermal ridge during vertebrate limb morphogenesis. *Development*. 1977, 41(1), 223-232.
- FAUS-PÉREZ, A., A. SANCHIS-CALVO a P. CODOÑER-FRANCH. Ciliopathies: an Update. *Pediatrics Research International Journal*. 2015, 1-23.
- FRANCOMANO, C. A., R. I. ORTIZ DE LUNA, T. W. HEFFERON, G. A. BELLUS, C. E. TURNER, E. TAYLOR, D. A. MEYERS, S. HALLORAN BLANTON, J. C. MURRAY, I. MCLINTOSH a J. T. HECHT. Localization of the achondroplasia gene to the distal 2.5 Mb of human chromosome 4p. *Human Molecular Genetics*. 1994, 3(5), 787–792.
- GENISCA, A. E., J. L. FRÍAS, C. S. BROUSSARD, M. A. HONEIN, E. J. LAMMER, C. A. MOORE, G. M. SHAW, J. C. MURRAY, W. YANG a S. A. RASMUSSEN. Orofacial clefts in the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2004. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009, 149A(6), 1149-1158
- GIELE, H., C. GIELE, C. BOWER a M. ALLISON. The incidence and epidemiology of congenital upper limb anomalies: A total population study. *The Journal of Hand Surgery*. 2001, 26(4), 628-634.

- GÜL, D. a ÖKTENLI, C. Evidence for autosomal recessive inheritance of split hand/split foot malformation: a report of nine cases. *Clinical Dysmorphology*. 2002, 11(3), 183-186.
- GUO, C., C. R. DEGNIN, M. B. LAEDERICH, G. P. LUNSTRUM, P. HOLDEN, J. BIHLMAIER, D. KRAKOW, Y.-J. CHO a W. A. HORTON. Sprouty 2 disturbs FGFR3 degradation in thanatophoric dysplasia type II: A severe form of human achondroplasia. *Cellular Signalling*. 2008, 20(8), 1471-1477.
- GUY, G. R., E. S. M. WONG, P. YUSOFF, S. CHANDRAMOULI, T. L. LO, J. LIM a C. W. FONG. Sprouty: how does the branch manager work? *Journal of Cell Science*. 2003, 116(15), 3061-3068.
- HACOHEN, N., S. KRAMER, D. SUTHERLAND, Y. HIROMI a M.A. KRASNOW. Sprouty Encodes a Novel Antagonist of FGF Signaling that Patterns Apical Branching of the Drosophila Airways. *Cell*. 1998, 92(2), 253-263.
- HANSEN, J., T. FLOSS, P. VAN SLOUN, E. M. FÜCHTBAUER, F.VAUTI, H. H.ARNOLD, F. SCHNÜTGEN, W. WURST, H. VON MELCHNER a P. RUIZ. A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, 100(17), 9918-9922.
- HAYASHI, S., A. KAWAGUCHI, I. UCHIYAMA, A. KAWASUMI-KITA, T. KOBAYASHI, H. NISHIDE, R. TSUTSUMI, K. TSURU, T. INOUE, H. OGINO, K. AGATA, K. TAMURA a H. YOKOYAMA. Epigenetic modification maintains intrinsic limb-cell identity in Xenopus limb bud regeneration. *Developmental Biology*. 2015. 406(2), 271-282.
- HAYCRAFT, C. J., B. BANIZS, Y. AYDIN-SON, Q. ZHANG, E. J. MICHAUD, B. K. YODER a G. BARSH. Gli2 and Gli3 Localize to Cilia and Require the Intraflagellar Transport Protein Polaris for Processing and Function. *PLoS Genetics*. 2005, 1(4).
- HAYCRAFT, C. J., Q. ZHANG, B.SONG, W. S. JACKSON, P. J. DETLOFF, R. SERRA a B. K. YODER. Intraflagellar transport is essential for endochondral bone formation. *Development*. 2007, 134(2), 307-316.
- HEDRICH, H. The Laboratory Mouse, 2nd Edition. Academic Press, 2012, ISBN 978-0123820099.
- HILL, P., B. WANG a U. RUTHER. The molecular basis of Pallister Hall associated polydactyly. *Human Molecular Genetics*. 2007, 16(17), 2089-2096.
- HORTON, W. A. a G. P. LUNSTRUM. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Mutations in Achondroplasia and Related Forms of Dwarfism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2002, 3(4), 381-385. *
- HRUBA, E., M. KAVKOVA, L. DALECKA, M. MACHOLAN, T. ZIKMUND, M. VARECHA, M. BOSAKOVA, J. KAISER, P. KREJCI, M. HOVORAKOVA, M. BUCHTOVA. Loss of Sprouty Produces a Ciliopathic Skeletal Phenotype in Mice Through Upregulation of Hedgehog Signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2021, 36(11), 2258-2274.
- HUANGFU, D., A. LIU, A. S. RAKEMAN, N. S. MURCIA, L. NISWANDER a K. V. ANDERSON. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*. 2003, 426(6962), 83-87.

- CHAMBERS, D. a I. MASON. Expression of sprouty2 during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling. *Mechanisms of Development*. 2000, 91(1-2), 361-364.
- CHEN, C. P., S. R. CHERN, J. C. SHIH, W. WANG, L. F. YEH, T. Y. CHANG, C. Y. TZEN. Prenatal diagnosis and genetic analysis of type I and type II thanatophoric dysplasia. *Prenatal Diagnosis*. 2001, 21(2), 89-95.
- CHEN, L., R. ADAR, X. YANG, E. O. MONSONEGO, C. LI, P. V. HAUSCHKA, A. YAYON a C.-X. DENG. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 1999, 104(11), 1517-1525.
- CHIANG, C., Y. LITINGTUNG, E. LEE, K. E. YOUNG, J. L. CORDEN, H. WESTPHAL a P. A. BEACHY. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*. 1996, 383(6599), 407-413.
- CHO, J. Y., C. GUO, M. TORELLO, G. P. LUNSTRUM, T. IWATA, C. DENG a W. A. HORTON. Defective lysosomal targeting of activated fibroblast growth factor receptor 3 in achondroplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, 101(2), 609-614.
- CHONG, A. Common congenital hand conditions. *Singapore Med J*. 2010, 51(12), 965-971. *
- CHRISMAN, K., R. KENNEY, J. COMIN, T. THAL, L. SUCHOCKI, Y. G. YUEH a D. P. GARDNER. Gestational ethanol exposure disrupts the expression of FGF8 and Sonic hedgehog during limb patterning. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2004, 70(4), 163-171.
- IANAKIEV, P., M. W. KILPATRICK, I. TOUDJARSKA, D. BASEL, P. BEIGHTON a P. TSIPOURAS. Split-Hand/Split-Foot Malformation Is Caused by Mutations in the p63 Gene on 3q27. *The American Journal of Human Genetics*. 2000, 67(1), 59-66.
- INGHAM, P. W. a A. P. MCMAHON. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*. 2001, 15(23), 3059-3087. *
- JILKA, R. L. The Relevance of Mouse Models for Investigating Age-Related Bone Loss in Humans. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2013, 68(10), 1209-1217.
- JOO, A., R. LONG, Z. CHENG, C. ALEXANDER, W. CHANG a O. D. KLEIN. Sprouty2 regulates endochondral bone formation by modulation of RTK and BMP signaling. *Bone*. 2016, 88, 170-179.
- KANO, H., K. KUROSAWA, E. HORII, S. IKEGAWA, H. YOSHIKAWA, H. KURAHASHI a T. TODA. Genomic rearrangement at 10q24 in non-syndromic split-hand/split-foot malformation. *Human Genetics*. 2005, 118(3-4), 477-483.
- KATO, Y. a M. KATO. FGF signaling inhibitor, SPRY4, is evolutionarily conserved target of WNT signaling pathway in progenitor cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2006, 17, 529-532.
- KAUFMAN, M. H. The Atlas of Mouse Development. Academic Press, 1992. ISBN 978-0124020351.

- KIM, H. J. a D. BAR-SAGI. Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004, 5(6), 441-450. *
- KLEIN, O. D., G. MINOWADA, R. PETERKOVA, KANGAS A., YU B. D., LESOT H., PETERKA M., JERNVALL J. a MARTIN G. R. Sprouty Genes Control Diastema Tooth Development via Bidirectional Antagonism of Epithelial-Mesenchymal FGF Signaling. *Developmental Cell*. 2006, 11(2), 181-190.
- KOUHARA, H., Y. R. HADARI, T. SPIVAK-KROIZMAN, J. SCHILLING, D. BAR-SAGI, I. LAX a J. SCHLESSINGER. A Lipid-Anchored Grb2-Binding Protein That Links FGF-Receptor Activation to the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Cell*. 1997, 89(5), 693-702.
- KOZMINSKI, K. G., K. A. JOHNSON, P. FORSCHER a J. L. ROSENBAUM. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993, 90(12), 5519-5523.
- KRAMER, S., M. OKABE, N. HACOEN, M.A. KRASNOW a Y. HIROMI. Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in Drosophila. *Development*. 1999, 126(11), 2515-2525.
- KUNOVA BOSAKOVA, M., M. VARECHA, M. HAMPL, DURAN I., NITA A., BUCHTOVA M., DOSEDELOVA H., MACHAT R., XIE Y., NI Z., MARTIN J., CHEN L., JANSEN G., KRAKOW D., KREJCI P. Regulation of ciliary function by fibroblast growth factor signaling identifies FGFR3-related disorders achondroplasia and thanatophoric dysplasia as ciliopathies. *Human Molecular Genetics*. 2018, 27(6), 1093-1105.
- LEEKSMAN, O. C., T. A. E. VAN ACHTERBERG, Y. TSUMURA, J. TOSHIMA, E. ELDERING, W. G. M.KROES, C. MELLINK, M. SPAARGAREN, K. MIZUNO, H. PANNEKOEK a C. J. M. DE VRIES. Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. *European Journal of Biochemistry*. 2002, 269(10), 2546-2556.
- LETAROUILLY, J. G., O. BROUX a A. CLABAUT. New insights into the epigenetics of osteoporosis. *Genomics*. 2019, 111(4), 793-798.
- LEVIN, M. Left–right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mechanisms of Development*. 2005, 122(1), 3-25. *
- LEWANDOSKI, M., X. SUN a G. R. MARTIN. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nature Genetics*. 2000, 26(4), 460-463.
- LEWIS, P. M., M. P. DUNN, J. A. MCMAHON, M. LOGAN, J. F. MARTIN, B. ST-JACQUES a A. P. MCMAHON. Cholesterol Modification of Sonic Hedgehog Is Required for Long-Range Signaling Activity and Effective Modulation of Signaling by Ptc1. *Cell*. 2001, 105(5), 599-612.
- LIM, J., E. S. M. WONG, S. H. ONG, P. YUSOFF, B. C. LOW a G. R. GUY. Sprouty Proteins Are Targeted to Membrane Ruffles upon Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275(42), 32837-32845.
- LIM, J., P. YUSOFF, E. S. M. WONG, S. CHANDRAMOULI, D.-H. LAO, C. W. FONG a G. R. GUY. The Cysteine-Rich Sprouty Translocation Domain Targets Mitogen-

- Activated Protein Kinase Inhibitory Proteins to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Plasma Membranes. *Molecular and Cellular Biology*. 2002, 22(22), 7953-7966.
- LITINGTUNG, Y., R. D. DAHN, Y. LI, J. F. FALLON a C. CHIANG. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*. 2002, 418(6901), 979-983.
- LIU, A., B.WANG a L. A. NISWANDER. Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development*. 2005, 132(13), 3103-3111.
- LO IACONO, N., S. MANTERO, A. CHIARELLI, E. GARCIA, A. A. MILLS, M. I. MORASSO, A. COSTANZO, G. LEVI, L. GUERRINI a G. R. MERLO. Regulation of Dlx5 and Dlx6 gene expression by p63 is involved in EEC and SHFM congenital limb defects. *Development*. 2008, 135(7), 1377-1388.
- LOGAN, M. Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development*. 2003, 130(26), 6401-6410. *
- LOCHOVSKA, K., R. PETERKOVA, Z. PAVLIKOVA a M.HOVORAKOVA. Sprouty gene dosage influences temporal-spatial dynamics of primary enamel knot formation. *BMC Developmental Biology*. 2015, 15(1).
- MANSKE, P. R. a K. C. OBERG. Classification and Developmental Biology of Congenital Anomalies of the Hand and Upper Extremity. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2009, 91(4), 3-18.
- MARIANI, F. V., C. P. AHN a G. R. MARTIN. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal–distal patterning. *Nature*. 2008, 453(7193), 401-405.
- MARTIN, G. R. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes & Development*. 1998, 12(11), 1571-1586. *
- MARTIN, L., N. KACI, V. ESTIBALS, N.GOUDIN, M. GARFA-TRAORE, C.BENOIST-LASSELIN, E. DAMBROISE a L. LEGEAI-MALLET. Constitutively-active FGFR3 disrupts primary cilium length and IFT20 trafficking in various chondrocyte models of achondroplasia. *Human Molecular Genetics*. 2018, 27(1), 1-13.
- MASON, J. M., D. J. MORRISON, B. BASSIT, M. DIMRI, H. BAND, J. D. LICHT a I.GROSS. Tyrosine Phosphorylation of Sprouty Proteins Regulates Their Ability to Inhibit Growth Factor Signaling: A Dual Feedback Loop. *Molecular Biology of the Cell*. 2004, 15(5), 2176-2188.
- MASUYA, H., T. SAGAI, S. WAKANA, K. MORIWAKI a T. SHIROISHI. A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes & Development*. 1995, 9(13), 1645-1653.
- MATSUBARA, H., D. SAITO, G. ABE, H.YOKOYAMA, T. SUZUKI a K. TAMURA. Upstream regulation for initiation of restricted Shh expression in the chick limb bud. *Developmental Dynamics*. 2017, 246(5), 417-430.
- MENO, C., A. SHIMONO, Y. SAIJOH, K. YASHIRO, K. MOCHIDA, S. OHISHI, S. NOJI, H. KONDOH a H. HAMADA. Lefty-1 Is Required for Left-Right Determination as a Regulator of lefty-2 and nodal. *Cell*. 1998, 94(3), 287-297.

- MENO, C., Y. SAIJOH, H. FUJII, M. IKEDA, T. YOKOYAMA, M. YOKOYAMA, Y. TOYODA a H. HAMADA. Left–right asymmetric expression of the TGF β -family member *lefty* in mouse embryos. *Nature*. 1996, 381(6578), 151-155.
- MERRER, M. L., F. ROUSSEAU, L. LEGEAI-MALLET, J.-C. LANDAIS, A. PELET, J. BONAVENTURE, M. SANAK, J. WEISSENBACH, C. STOLL, A. MUNNICH a P. MAROTEAUX. A gene for achondroplasia–hypochondroplasia maps to chromosome 4p. *Nature Genetics*. 1994, 6(3), 318-321.
- MINOWADA, G., L.A. JARVIS, C.L. CHI, A. NEUBUSER, X. SUN, N. HACOEN, M.A. KRASNOW a G.R. MARTIN. Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development*. 1999, 126(20), 4465-4475.
- MIRAOU, H. a P. J. MARIE. Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Crosstalk in Skeletogenesis. *Science Signaling*. 2010, 3(146), re9. *
- MIURA, T. a M. SUZUKI. Clinical differences between typical and atypical cleft hand. *Journal of Hand Surgery*. 1984, 9(3), 311-315.
- MIURA, T. Syndactyly And Split Hand. Supplement. *The Hand*. 1978, 10(1), 99-104.
- MOON, A. M. a M. R. CAPECCHI. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nature Genetics*. 2000, 26(4), 455-459.
- NARUSE, T., M. TAKAHARA, M. TAKAGI, K. C. OBERG a T. OGINO. Busulfan-induced central polydactyly, syndactyly and cleft hand or foot: A common mechanism of disruption leads to divergent phenotypes. *Development, Growth & Differentiation*. 2007, 49(6), 533-541.
- NASKI, M. C., Q. WANG, J. XU a D. M. ORNITZ. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nature Genetics*. 1996, 13(2), 233-237.
- NEUGEBAUER, J. M., J. D. AMACK, A. G. PETERSON, B. W. BISGROVE a H. J. YOST. FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature*. 2009, 458(7238), 651-654.
- NEWBURY-ECOB, R. A., R. LEANAGE, J. A. RAEBURN a I. D. YOUNG. Holt-Oram syndrome: a clinical genetic study. *Journal of Medical Genetics*. 1996, 33(4), 300-307.
- NUNES, M. E., G. SCHUTT, R. P. KAPUR, F. LUTHARDT, M. KUKOLICH, P. BYERS a J. P. EVANS. A second autosomal split hand/split foot locus maps to chromosome 10q24-q25. *Human Molecular Genetics*. 1995, 4(11), 2165-2170.
- NUTT, J. N., A. E. FLATT a M. CHIR. Congenital central hand deficit. *The Journal of Hand Surgery*. 1981, 6(1), 48-60.
- OGINO, T., A. MINAMI a H. KATO. Clinical features and roentgenograms of symbrachydactyly. *The Journal of Hand Surgery: Journal of the British Society for Surgery of the Hand*. 1989, 14(3), 303-306.
- OHUCHI, H., T. NAKAGAWA, A. YAMAMOTO, A. ARAGA, T. OHATA, Y. ISHIMARU, H. YOSHIOKA, T. KUWANA, T. NOHNO, M. YAMASAKI, N. ITOH a S. NOJI. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*. 1997, 124(11), 2235-2244.

- ONG, S. H., G. R. GUY, Y. R. HADARI, S. LAKS, N. GOTOH, J. SCHLESSINGER a I. LAX. FRS2 Proteins Recruit Intracellular Signaling Pathways by Binding to Diverse Targets on Fibroblast Growth Factor and Nerve Growth Factor Receptors. *Molecular and Cellular Biology*. 2000, 20(3), 979-989.
- ORIOLO, I. M., E. E. CASTILLA a J. G. BARBOSA-NETO. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *Journal of Medical Genetics*. 1986, 23(4), 328-332.
- ORNITZ, D. M a N. ITOH. Fibroblast growth factors. *Genome Biology*. 2001, 2(3), 1-12. *
- ORNITZ, D. M. a P. J. MARIE. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes & Development*. 2015, 29(14), 1463-1486. *
- ORNITZ, D. M. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2005, 16(2), 205-213. *
- PARR, B. A. a A. P. MCMAHON. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*. 1995, 374(6520), 350-353.
- PASOVSKÁ, M. Sprouty 2 v raném vývoji se zaměřením na kraniofaciální oblast a vývoj končetin. Praha, 2019. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra antropologie a genetiky člověka. Vedoucí práce Hovořáková, Mária.
- PASSOS-BUENO, M. R, W. R. WILCOX, E. W. JABS, A. L. SERTIÉ, L. G. ALONSO a H. KITOH. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Human Mutation*. 1999, 14(2), 115-25
- PATTON, J. T. a M. H. KAUFMAN. The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bones of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse. *Journal of anatomy*. 1995, 186(1), 175-185.
- PETERKA, M., H. LESOT a R. PETERKOVA. Body Weight in Mouse Embryos Specifies Staging of Tooth Development. *Connective Tissue Research*. 2002, 43(2-3), 186-190.
- PETERS, K. G., S. WERNER, G. CHEN a L. T. WILLIAMS. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development*. 1992, 114(1), 233-243.
- PIZETTE, S., C. ABATE-SHEN a L. NISWANDER. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development*. 2001, 128(22), 4463-4474.
- PRINOS, P., T. COSTA, A. SOMMER, M. W. KILPATRICK a P. TSIPOURAS. A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Human Molecular Genetics*. 1995, 4(11), 2097-2101.
- REICH, A., A. SAPIR a B. SHILO. Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development*. 1999, 126(18), 4139-4147.
- RIDDLE, R. D., R. L. JOHNSON, E. LAUFER a C. TABIN. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 1993, 75(7), 1401-1416.
- RITMAN, E. L. Micro-Computed Tomography—Current Status and Developments. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2004, 6(1), 185-208. *
- RIX, S., A. CALMONT, P. J. SCAMBLER a P. L. BEALES. An Ift80 mouse model of short rib polydactyly syndromes shows defects in hedgehog signalling without loss or malformation of cilia. *Human Molecular Genetics*. 2011, 20(7), 1306-1314.

- ROBERTS, S. H., H. E. HUGHES, S. J. DAVIES a A. L. MEREDITH. Bilateral split hand and split foot malformation in a boy with a de novo interstitial deletion of 7q21.3. *Journal of Medical Genetics*. 1991, 28(7), 479-481.
- ROSENBAUM, J. L. a G. B. WITMAN. Intraflagellar transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002, 3(11), 813-825. *
- ROUSSEAU F., P.SAUGIER, M. L. MERRER, A. MUNNICH, A. L. DELEZOIDE, P. MAROTEAUX, J. BONAVENTURE, F. NARCY a M. SANAK. Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nature Genetics*. 1995, 10(1), 11-12.
- ROUSSEAU, F., J. BONAVENTURE, L. LEGEAI-MALLET, A. PELET, J.-M. ROZET, P.MAROTEAUX, M. L. MERRER a A.MUNNICH. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*. 1994, 371(6494), 252-254.
- SARGAR, K. M., A. K. SINGH a S. C. KAO. Imaging of Skeletal Disorders Caused by Fibroblast Growth Factor Receptor Gene Mutations. *RadioGraphics*. 2017, 37(6), 1813-1830.
- SEGEV, O., I. CHUMAKOV, Z. NEVO, D. GIVOL, L. MADAR-SHAPIRO, Y. SHEININ, M. WEINREB a A. YAYON. Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3G380R transgenic mice. *Human Molecular Genetics*. 2000, 9(2), 249-258.
- SEKINE, K., H. OHUCHI, M. FUJIWARA, M. YAMASAKI, T. YOSHIZAWA, T. SATO, N. YAGISHITA, D. MATSUI, Y. KOGA, N. ITOH a S. KATO. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nature Genetics*. 1999, 21(1), 138-141.
- SHAZEEB, M. S., M. K. COX, A. GUPTA, W. TANG, K. SINGH, C. T. PRYCE, R. FOGLE, Y. MU, W. D. WEBER, D. S. BANGARI, X. YING a Y. SABBAGH. Skeletal Characterization of the Fgfr3 Mouse Model of Achondroplasia Using Micro-CT and MRI Volumetric Imaging. *Scientific Reports*. 2018, 8(1).
- SHIANG, R., L. M. THOMPSON, Y.-Z. ZHU, D. M. CHURCH, T. J. FIELDER, M. BOCIAN, S. T. WINOKUR aj. J. WASMUTH. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*. 1994, 78(2), 335-342.
- SHIMIZU, H., G. S. LEE, S.R. BEEDANAGARI a M. D. COLLINS. Altered localization of gene expression in both ectoderm and mesoderm is associated with a murine strain difference in retinoic acid-induced forelimb ectrodactyly. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2007, 79(6), 465-482.
- SHINOHARA, K., A. KAWASUMI, A. TAKAMATSU, S. YOSHIBA, Y. BOTILDE, N. MOTOYAMA, W. REITH, B. DURAND, H. SHIRATORI a H. HAMADA. Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. *Nature Communications*. 2012, 3(1).
- SCHERER, S. W., P. POORKAJ, T. ALLEN, J. KIM, D. GESHURI, M. NUNES, S. SODER, K. STEPHENS, R. A. PAGON a M. A. PATTON. Fine mapping of the autosomal dominant split hand/split foot locus on chromosome 7, band q21.3-q22.1. *American journal of human genetics*. 1994, 55(1), 12-20.
- SCHLESSINGER, J., A. N. PLOTNIKOV, O. A. IBRAHIMI, A. V. ELISEENKOVA, B. K. YEY, A. YAYON, R. J. LINHARDT a M. MOHAMMADI. Crystal Structure of a

- Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization. *Molecular Cell*. 2000, 6(3), 743-750.
- SLEEMAN, M., J. FRASER, M. MCDONALD, YUAN S., WHITE D., GRANDISON P., KUMBLE K., WATSON J. D. a MURISON J. G. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene*. 2001, 271(2), 171-182.
- SMITH, J. C. a L. WOLPERT. Pattern formation along the anteroposterior axis of the chick wing: the increase in width following a polarizing region graft and the effect of X-irradiation. *Development*. 1981, 63(1), 127-144.
- SONG, B., C. J. HAYCRAFT, H. SEO, B. K. YODER a R. SERRA. Development of the post-natal growth plate requires intraflagellar transport proteins. *Developmental Biology*. 2007, 305(1), 202-216.
- SOSZYŃSKA, A., K. KLIMCZEWSKA a A. SUWIŃSKA. FGF/ERK signaling pathway: how it operates in mammalian preimplantation embryos and embryo-derived stem cells. *The International Journal of Developmental Biology*. 2019, 63(3-4-5), 171-186.
- SOWIŃSKA-SEIDLER, A., M. SOCHA a A. JAMSHEER. Split-hand/foot malformation - molecular cause and implications in genetic counseling. *Journal of Applied Genetics*. 2014, 55(1), 105-115. *
- STRATFORD, T., C. HORTON a M. MADEN. Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Current Biology*. 1996, 6(9), 1124-1133.
- SUN, X., F. V. MARIANI a G. R. MARTIN. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*. 2002, 418(6897), 501-508.
- SWANSON, A. B. A classification for congenital limb malformations. *The Journal of Hand Surgery*. 1976, 1(1), 8-22.
- TAKETOMI, T., T. ONIMURA, D. YOSHIGA, D. MURATSU, T. SANUI, T. FUKUDA, J. KUSUKAWA a S. NAKAMURA. Sprouty2 is involved in the control of osteoblast proliferation and differentiation through the FGF and BMP signaling pathways. *Cell Biology International*. 2018, 42(9), 1106-1114.
- TANIGUCHI, K., T. AYADA, K. ICHIYAMA, R. KOHNO, Y. YONEMITSU, Y. MINAMI, A. KIKUCHI, Y. MAEHARA a A. YOSHIMURA. Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, 352(4), 896-902.
- TATWADE, B. a M. HIWARKAR. An Anatomical study of Cleft hand in North – East population of Assam. *Academia Anatomica International*. 2019, 5(1).
- TEVEN, C. M., X. LIU, N. HU, N. TANG, S. H. KIM, E. HUANG, K. YANG, M. LI, J. L. GAO, H. LIU, R. B. NATALE, G. LUTHER, Q. LUO, L. WANG, R. RAMES, Y. BI, J. LUO, H. H. LUU, R. C. HAYDON, R. R. REID a T. C. HE. Epigenetic Regulation of Mesenchymal Stem Cells: A Focus on Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Stem Cells International*. 2011, 2011, 1-18.
- THOMPSON, L. M., S. PLUMMER, M. SCHALLING, M. R. ALTHERR, J. F. GUSELLA, D. E. HOUSMAN a J. J. WASMUTH. A gene encoding a fibroblast growth factor receptor isolated from the Huntington disease gene region of human chromosome 4. *Genomics*. 1991, 11(4), 1133-1142.

- TUMMALA, P., E. J. ARNSDORF a C. R. JACOBS. The Role of Primary Cilia in Mesenchymal Stem Cell Differentiation: A Pivotal Switch in Guiding Lineage Commitment. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2010, 3(3), 207-212.
- UGUR, S. A. a A. TOLUN. Homozygous WNT10b mutation and complex inheritance in Split-Hand/Foot Malformation. *Human Molecular Genetics*. 2008, 17(17), 2644-2653.
- UNSINN, K. M., N. NEU, A. KREJCI, A. POSCH, G. MENARDI a I. GASSNER. Pallister-Hall syndrome and McKusick-Kaufmann syndrome: one entity? *Journal of Medical Genetics*. 1995, 32(2), 125-128.
- VESELA, B., E. SVANDOVA, M.HOVORAKOVA, R. PETERKOVA, A. KRATOCHVILOVA, M. PASOVSKA, A. RAMESOVA, H. LESOT a E. MATALOVA. Specification of Sprouty2 functions in osteogenesis in in vivo context. *Organogenesis*. 2019, 15(4), 111-119.
- WANG, B., J. F. FALLON a P. A. BEACHY. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*. 2000, 100(4), 423-434.
- WANG, C., X. YUAN a S. YANG. IFT80 is essential for chondrocyte differentiation by regulating Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Experimental Cell Research*. 2013, 319(5), 623-632.
- WILCOX, W. R., P. L. TAVORMINA, D. KRAKOW, H. KITOH, R. S. LACHMAN, J. J. WASMUTH, L. M. THOMPSON a D. L. RIMOIN. Molecular, radiologic and histopathologic correlations in thanatophoric dysplasia. *American Journal of Medical Genetics*. 1998, 78(3), 274-281.
- WILKIE, A. O.M., S. J. PATEY, S. KAN, A. M. W. VAN DEN OUWELAND a B. C. J. HAMEL. FGFs, their receptors, and human limb malformations: Clinical and molecular correlations. *American Journal of Medical Genetics*. 2002, 112(3), 266-278.
- WILKIN, D. J., J. K. SZABO, R. CAMERON, S. HENDERSON, G. A. BELLUS, M. L. MACK, I. KAITILA, J. LOUGHLIN, A. MUNNICH, B. SYKES, J. BONAVENTURE, C. A. FRANCOMANO. Mutations in Fibroblast Growth-Factor Receptor 3 in Sporadic Cases of Achondroplasia Occur Exclusively on the Paternally Derived Chromosome. *The American Journal of Human Genetics*. 1998, 63(3), 711-716.
- WYNNE-DAVIES, R., W. K. WALSH a J. GORMLEY. Achondroplasia and hypochondroplasia. Clinical variation and spinal stenosis. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*. 1981, 63(4), 508-515.
- XU, X., M. WEINSTEIN, C. LI, M. NASKI, R. I. COHEN, D. M. ORNITZ, P. LEDER a C. DENG. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development*. 1998, 125(4), 753-765.
- YANG, S. a C. WANG. The intraflagellar transport protein IFT80 is required for cilia formation and osteogenesis. *Bone*. 2012, 51(3), 407-417.
- YU, K., A. B. HERR, G. WAKSMAN a D. M. ORNITZ. Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 97(26), 14536-14541.

- YUAN, X. a S. YANG. Primary Cilia and Intraflagellar Transport Proteins in Bone and Cartilage. *Journal of Dental Research*. 2016, 95(12), 1341-1349.
- YUAN, X., R. A. SERRA a S. YANG. Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015, 1335(1), 78-99. *
- ZELLER, R. It Takes Time to Make a Pinky: Unexpected Insights into How SHH Patterns Vertebrate Digits. *Science's STKE*. 2004, 2004(259), 53.
- ZHANG, S., Y. LIN, P. ITÄRANTA, A. YAGI a S. VAINIO. Expression of Sprouty genes 1, 2 and 4 during mouse organogenesis. *Mechanisms of Development*. 2001, 109(2), 367-370.
- ZHU, J., E. NAKAMURA, M.-T. NGUYEN, X BAO, H. AKIYAMA a S. MACKEM. Uncoupling Sonic Hedgehog Control of Pattern and Expansion of the Developing Limb Bud. *Developmental Cell*. 2008, 14(4), 624-632.
- ZÚÑIGA, A., A. P. G. HARAMIS, A. P. MCMAHON a R.ZELLER. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature*. 1999, 401(6753), 598-602.

* sekundární citace

Internetové zdroje:

RUBERTE, J., A. CARRETERO, H. CATER, C. LALLY a G. GRÀCIA. *X-Ray Annotation Mouse Atlas*. 2021.

<https://www.mousephenotype.org/wp-content/uploads/2021/03/X-Ray-Annotation-Mouse-Atlas.pdf>