

Tajemství chromozomů našeho spolunocležníka – štěnice domácí

Štěnice domácí (*Cimex lectularius*) patří spolu se štěnicí tropickou (*C. hemipterus*) mezi nejvýznamnější ektoparazity člověka (Živa 2014, 5: 247–249). Přestože byly tyto krevsající ploštice z čeledi Cimicidae v polovině 20. stol. u nás, resp. v západním světě téměř vymýceny, v posledních desetiletích se opět šíří a dostávají do popředí zájmu (viz také Živa 2008, 6: 274–276). Za nabytí zašlé slávy vděčí zákazu DDT a masivnímu rozvoji dopravy. V šíření jim napomáhá i fakt, že v rané fázi napadení, tedy v období před velkým pomnožením a zamořením širokého okolí, není jejich přítomnost mnohdy patrná. Štěnice jsou velmi zajímavým objektem i pro studium chromozomů, protože u nich najdeme hned několik neobvyklých cytogenetických fenoménů. Jejich chromozomy mají holokinetickou a výrazně modifikovanou stavbu s neobvyklým rozchodem během meiózy. K tomu se vyznačují různými počty pohlavních chromozomů, a to v unikátním rozsahu variant. Uvedené cytogenetické vlastnosti známe sice i u jiných ploštic, ale jejich společný výskyt u jednoho druhu je doložen zatím pouze u štěnice domácí.

Stavba chromozomů štěnice domácí

Již samotná stavba chromozomů štěnic je v porovnání se situací známou u obratlovců poněkud nestandardní. Chromozomy se obecně v metafázi buněčného dělení skládají ze dvou chromatid (každá obsahuje jednu dvoušroubovici DNA), u většiny organismů včetně obratlovců spojených krátkým úsekem – centromerou. Na vnější straně centromery se vytváří kinetochor – specifická nukleoproteinová struktura, na kterou se upínají mikrotu-

buly dělicího vřeténka. Tímto způsobem vymezený kinetochor umožňuje navázání mikrotubulů pouze v jediném místě a takové chromozomy označujeme jako monocentrické (obr. 2). Naproti tomu kinetochor holokinetických chromozomů takto lokalizovaný není a rozprostírá se po většině délky chromozomu. Tyto chromozomy se také nazývají holocentrické, s difuzní centromerou či kinetochorem, nebo polycentrické (podle některých představ se centromera/kinetochor vyskytuje ve formě

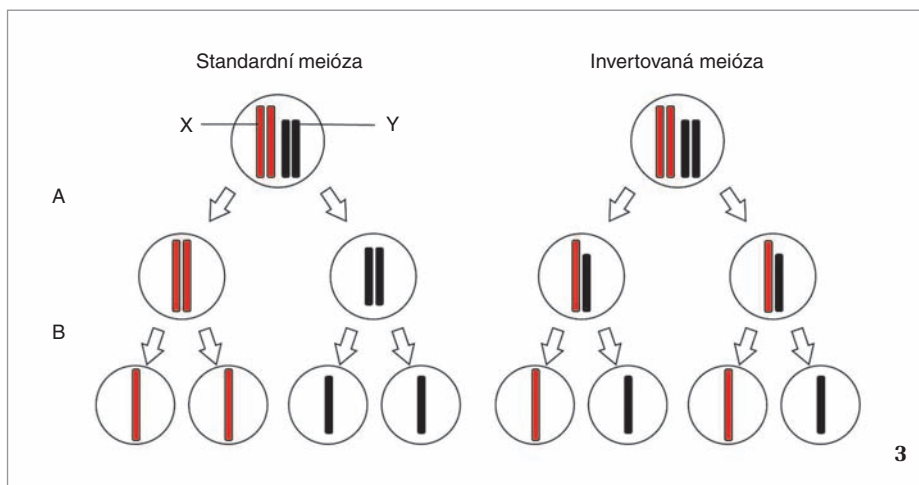
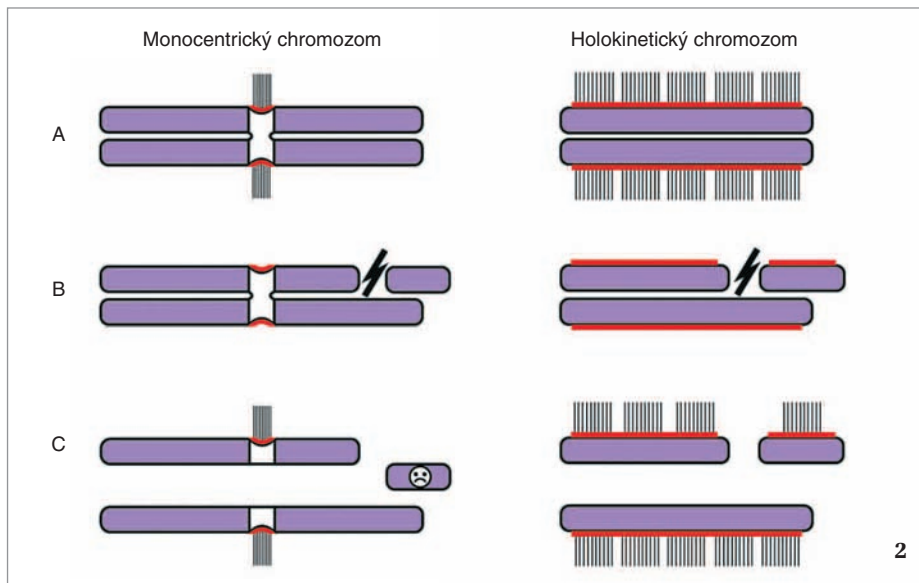
mnoha roztroušených izolovaných ostřůvků). Důležité však je, že takto utvářený kinetochor umožňuje navázání mikrotubulů po celé délce chromozomu, nebo aspoň po jeho větší části (např. u chrostíka *Anabolia furcata* se kinetochor rozprostírá přibližně na 40 % chromozomu).

Holokinetické chromozomy se u obratlovců nevyskytují. Proto je celkem překvapivé, o jak častý fenomén jde mezi bezobratlými a rostlinami. Odhaduje se přibližně půl milionu druhů s tímto typem chromozomů. Z protistů to jsou někteří nálevníci (Ciliophora) a mřížovci (Radiolaria), u rostlin zejména zástupci čeledi sítinovitých (*Juncaceae*) a šáchorovitých (*Cyperaceae*), dále rosnatky (*Drosera*) a parazitické kokotice (*Cuscuta*). Z bezobratlých je nacházíme u velkého množství hlístic (Nematoda). U členovců mají holokinetické chromozomy šestiocí pavouci nadčeledi Dysderoidea, štíři čeledi Buthidae a někteří roztoči (Acarina), dále někteří korýši (Crustacea) a zejména hmyz (Insecta). Z hmyzu holokinetické chromozomy najdeme u vážek (Odonata), škvorů (Dermaptera), drobnělek (Zoraptera), pševků (Psocoptera) včetně všů a všenek (Phthiraptera), u třásněnek (Thysanoptera), všech polokřídlých (Hemiptera), chrostíků (Trichoptera) a motýlů (Lepidoptera). Evolučně je holokinetismus velmi stabilní a přítomný vždy u celé širší taxonomické skupiny organismů. Z výskytu holokinetických chromozomů napříč takto bohatým spektrem vyplývá jejich možný opakovaný, nezávislý vznik během evoluce. Avšak jak tomu v podobných případech bývá, existují i hypotézy, že jsou evolučně původní, a teprve později se z nich opakovaně vyvíjely chromozomy monocentrické.

Zajímavý následek má holokinetická stavba chromozomů pro evoluci karyotypu. Předpokládá se, že holokinetické chromozomy významně usnadňují chromozomální přestavby, jako jsou fúze a fragmentace, a jejich následnou fixaci. Při fúzích nebo rozpadech holokinetických chromozomů nevznikají chromozomy s atypickým počtem centromer (např. dicentrické chromozomy nebo acentrické fragmenty), které by měly vážné problémy při následném buněčném dělení (obr. 2). V případě těchto přestaveb holokinetické chromatidy stále obsahují jeden funkční kinetochor, který umožní navázání mikrotubulů a správné rozdělení genetické informace.

1 Shluk štěnic domácích (*Cimex lectularius*). Čeleď Cimicidae obsahuje 110 druhů zařazených do 22 rodů, na člověku sají krev tři druhy: štěnice domácí z mírného pásu, š. tropická (*C. hemipterus*) a africká *Leptocimex boueti*. Štěnice žijí skrytě a vylézají pouze v noci, aby se nakrmily. Nasátí jedinci se páří unikátním způsobem – traumatickou inseminací, kdy samec mečovitým penisem perforuje tělní stěnu samice na specifickém místě (viz Živa 2008, 6: 274–276). Samice klade do pěti vajíček denně, až 500 za život. Vajíčka se líhnou přibližně za 10 dní a vývoj v dospělce trvá zhruba pět týdnů v pěti larválních instarech, přičemž v každém z nich musí larva přijmout potravu.





Proto jsou fúze a fragmentace považovány za hlavní mechanismy karyotypové evoluce organismů s holokinetickými chromozomy. U ploštic jde zejména o přestavby pohlavních chromozomů (viz dále).

Úsuzuje se, že by proces fúze mohl být častější než fragmentace. Pro všechny chromozomy je totiž nezbytné mít funkční telomery, které díky své specifické stavbě brání degradaci konců chromozomů (viz Živa 2002, 6: 245–248). Po fúzi dvou chromozomů zůstávají telomerické oblasti zachovány, ale při štěpení se musejí nějak obnovit. Telomery jsou obvykle tvořeny dlouhými repeticemi evolučně velmi stabilní sekvence několika nukleotidů. Nejběžnější opakující se motiv u členovců – sekvence TTAGG – je kratší než u většiny živočichů včetně obratlovců (TTAGGG) nebo cévnatých rostlin (TTTAGGG). Po každém buněčném dělení se telomerická DNA somatických buněk zkracuje (projev buněčného stárnutí), pouze u kmenových buněk dojde vždy opět k prodloužení. Ačkoli se v nedávné době podařilo objevit evolučně původní sekvenci členovců TTAGG u mohutnatky *Lethocerus patruelis*, zástupce jedné z bazálních čeledí ploštic Belostomatidae, u ostatních ploštic se nevyskytuje, a ani žádný jiný z obvyklých telomerických motivů. Navzdory intenzivním snahám několika výzkumných týmů zůstává zatím telomerická sekvence štěnic neznámá. Je možné, že se uplatňuje nějaký alternativní mechanismus

2 Monocentrické a holokinetické chromozomy (A). Kinetochor (červeně) monocentrických chromozomů je lokalizován pouze v jednom místě chromozomu. Chromatidový zlom u takového chromozomu (B) generuje acentrický fragment bez možnosti navázání mikrotubulů (tmavé proužky) a přenosu fragmentu do dceřiného jádra (C). Naproti tomu holokinetický chromozom (vpravo) nese kinetochor po celé své délce. Po případném zlomu se mohou mikrotubuly navázat na kinetochor fragmentu, což umožní přenos fragmentu do dceřiného jádra.

3 Schematické porovnání standardní a invertované meiózy na příkladu pohlavních chromozomů XY. Během standardní meiózy, např. u člověka, segregují v prvním meiotickém dělení dvouchromatidové chromozomy (A), v druhém meiotickém dělení (B) pak dochází k rozchodu jednotlivých chromatid. Při invertované meióze např. u štěnic je tato posloupnost obrácena. Nejprve se oddělují sesterské chromatidy. Produktem prvního meiotického dělení jsou tak dvě identická jádra s jednochromatidovými chromozomy X a Y. Vlastní rozchod chromozomů XY se odehrává až v druhém meiotickém dělení. Orig. D. Sadílek a M. Forman (obr. 2 a 3)

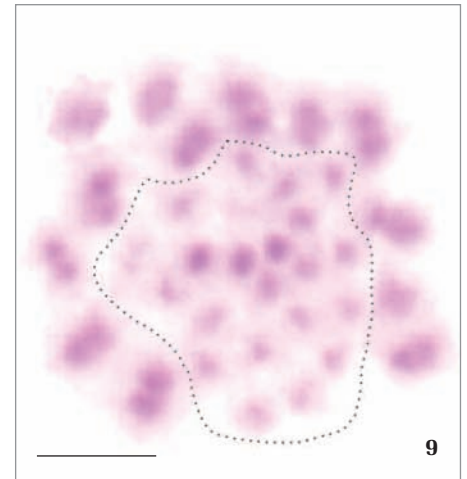
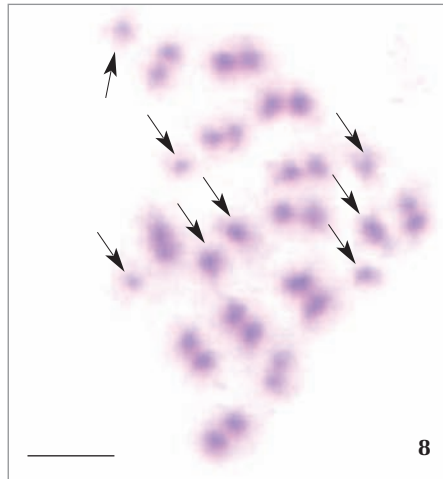
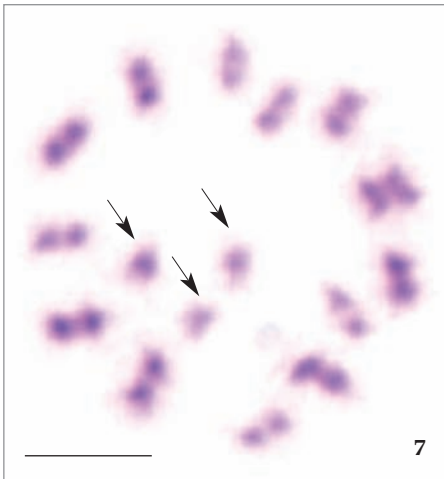
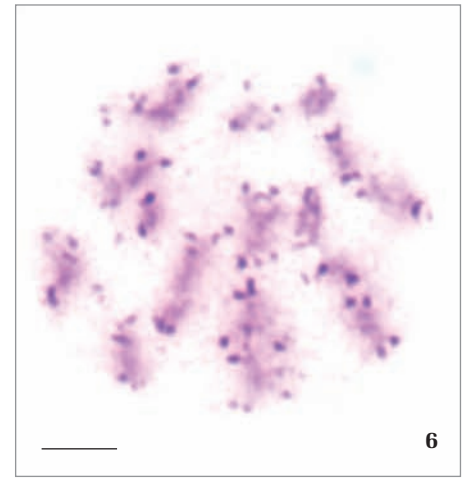
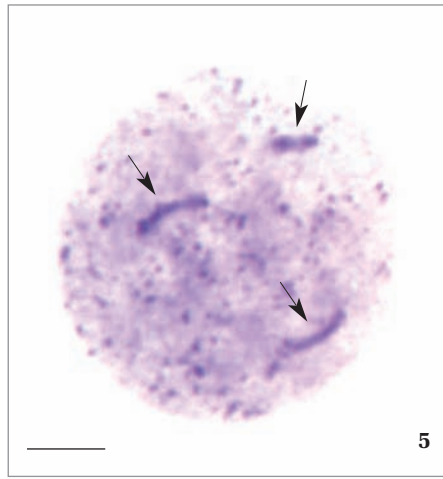
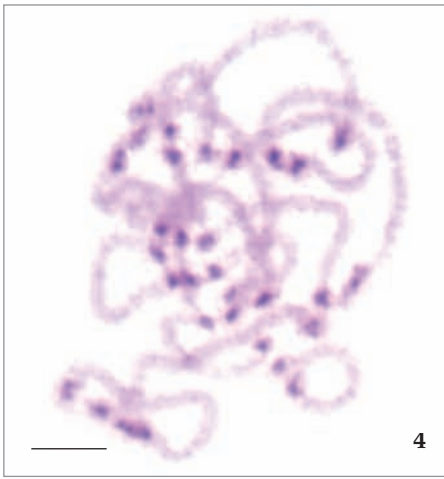
prodlužování telomer, jako např. retrotranspozony nebo rekombinace u některých dvoukřídlých (Diptera). Doufejme, že s rutinním rozvojem celogenomových projektů se brzy podaří stavbu telomer u štěnice domácí vysvětlit.

Modifikace meiotického dělení

Meióza je typ dělení buněk, kdy ve dvou po sobě jdoucích děleních vznikají haploidní gamety (s jednou sadou chromozomů). Vzhledem k tomu, že významný zdroj materiálu pro cytogenetickou analýzu bezobratlých jsou pohlavní tkáně, bývá studium jejich meiózy velice časté. Meióza standardně probíhá tzv. preredukčním způsobem. Po rekombinaci se od sebe v metafázi I oddělí homologní dvouchromatidové chromozomy (redukční dělení) a v metafázi II se rozcházejí sesterské chromatidy chromozomů (ekvační dělení). U většiny ploštic však probíhá invertovaná meióza (postredukční dělení), kdy je tato posloupnost obrácena. Při invertované meióze se sesterské chromatidy rozcházejí již na konci metafáze I, zatímco ve druhém meiotickém dělení se oddělují (redukčně) jednochromatidové chromozomy. Invertovaná meióza ploštic nezahrnuje celý genom, omezuje se pouze na pohlavní chromozomy, které jsou u většiny ploštic typu XY (obr. 3). Tento typ meiózy najdeme vzácně, a to pouze u několika druhů rostlin, u stonožek a klepítkáčů, z hmyzu pak u váček, polokřídlých a motýlů.

U samců štěnice domácí, stejně jako u některých dalších ploštic, se během profáze prvního meiotického dělení vyskytuje další specifická modifikace – difuzní stadium. Následuje přímo po pachytene (obr. 4) a během něj se bivalenty téměř úplně rozvolní, takže jádro připomíná interfázi. Zajímavé je, že pohlavní chromozomy nejsou rozvolněné, naopak se hyperspiralizují a vystupují jako výrazné barvitelnější útvary (obr. 5). V průběhu dělení chromozomů je obecně potlačen přepis genetické informace, ale rozvolnění chromozomů umožňuje transkripčnímu aparátu přístup k vláknu DNA. V této fázi tedy pravděpodobně dochází k transkripci autozomálních genů a následně produkci proteinů. Obdobně fungují např. štetkovité (lampbrush) chromozomy v oocytech obojživelníků, plazů, ptáků a některých bezobratlých. Během diplotene vystupují z těchto obřích chromozomů stovky postranních smyček chromatinu, na nichž se masivně exprimují některé geny, zatímco zbylá část genomu zůstává kondenzovaná a transkripčně neaktivní.

Po difuzním stadiu následuje opětovná kondenzace, všechny chromozomy se individualizují a postupně přecházejí do postpachytene (obr. 6), stadia nahrazujícího u samců štěnic fáze diplotene a diakineze. Tato poslední dvě stadia standardní profáze I u ploštic neprobíhají díky achiasmatické meióze, která bývá u organismů s holokinetickými chromozomy relativně častá. Při standardní meióze jsou v diplotene homologní chromozomy spojeny v bivalentu pomocí tzv. chiasm (překřížení), která svou polohou odpovídají místům rekombinace. Při achiasmatické meióze k rekombinaci nedochází a chiasma se nevytváří. Samci většiny



4 až 6 Profáze prvního meiotického dělení u štěnice domácí. Na prvním snímku pachytenní bivalenty samice, v tomto stadiu se odehrává u samic crossing-over (obr. 4). Difuzní stadium samce s velmi rozvolněnými bivalenty připomíná interfázni jádro. Pohlavní chromozomy jsou výrazně hyperspiralizovány (šipky, 5). Postpachytene – chromozomy postupně kondenzují z difuzního stadia (6). Měřítka 5 μm . Blíže v textu **7 až 9** Invertovanou meiózu lze u štěnice dobře pozorovat zejména v metafázi druhého meiotického dělení samců. Jednochromatidové pohlavní chromozomy (označeno) jsou obklopeny 13 páry dvouchromatidových autozomů. Samčí figury na snímcích se liší systémem pohlavních chromozomů (obr. 7: $2n = 29, X_1X_2Y$; obr. 8: $2n = 34, X_{1-7}Y$; obr. 9: $2n = 47, X_{1-20}Y$). Měřítka 5 μm

druhů ploštic vykazují tento typ meiózy jen mezi pohlavními chromozomy X a Y, avšak štěnice, stejně jako několik dalších skupin ploštic (např. klopuškovití – Miridae a lovčicovití – Nabidae), mají rekombinace potlačeny u všech chromozomů. Meióza samic se dá jen obtížně pozorovat a prakticky o ní nic nevíme. Bylo však prokázáno, že u druhů s úplnou achiasmatickou meiózou u samců jsou rekombinace u samic zachovány.

Vnitrodruhová variabilita pohlavních chromozomů

Chromozomové přestavby, které vedou ke změnám v počtu chromozomů bývají společným reprodukčně izolačním mecha-

nismem. Změny počtu chromozomů tedy často indikují přítomnost kryptických druhů. To u štěnic rozhodně neplatí. Křížení jedinců s diametrálně rozdílným počtem pohlavních chromozomů nepředstavuje žádnou reprodukční bariéru a vzniklé potomstvo je schopné dalšího rozmnožování. Ploštice se obecně vyznačují širokým spektrem systémů pohlavních chromozomů. Není tedy překvapením, že u ploštic sehrály významnou roli již při objevu pohlavních chromozomů. Právě u ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) Hermann Henkor (15 % druhů). Zbytek tvoří druhy s výrazně odvozenými systémy, např. několika různými chromozomy X – X_1X_2Y a X_1X_2O (u samic je v obou systémech konstituce $X_1X_1X_2X_2$).

Jistá variabilita pohlavních chromozomů byla objevena i mimo rod *Cimex*. Např. jihoamerická mohutnatka *Belostoma plebejum* (Belostomatidae) existuje na jedné lokalitě v Argentině ve dvou variantách s jedním nebo dvěma chromozomy X. Zatímco u většiny samců se vyskytuje karyotyp $2n = 16, XY$ (diploidní počet 16 chromozomů, z toho 14 autozomů a po-

hlavní chromozomy XY), zhruba čtvrtina samců má $2n = 17, X_1X_2Y$. Po změření chromozomů se zjistilo, že součet délek X_1 a X_2 odpovídá původnímu X, což ukazuje na jeho rozpad. Obdobný příklad zvýšení počtu pohlavních chromozomů známe u naší vroubenky smrduté (*Coreus marginatus*, Coreidae – $2n$ samců = 22, X_1X_2O); u ní byla zaznamenána populace se samčím karyotypem $2n = 23, X_1X_2X_3O$. U jihoafrické ploštice *Thaumastella namaquensis* (Thaumastellidae) jsou také popsány populace s různými systémy pohlavních chromozomů. Zde však nedošlo k fragmentaci, ale k začlenění autozomu do systému pohlavních chromozomů a vzniku neopohlavního chromozomu (viz např. Živa 2010, 3: 128–130). Původní karyotyp samců $2n = 18, XY$ se tak transformoval na $2n = 17, X_1X_2Y$.

U štěnicovitých je však variabilita v počtu pohlavních chromozomů nesrovnatelně vyšší. V této čeledi byly zdokumentovány tři druhy s výraznou vnitrodruhovou variabilitou chromozomů X – štěnice domácí a dva druhy rodu *Paracimex* z jihovýchodní Asie, *P. borneensis* a *P. capitatus*, které parazitují na rorýsech rodu *Chaetura*. Základní samčí karyotyp pro celý rod *Paracimex* je $2n = 39, X_1X_2Y$, avšak u *P. borneensis* se podařilo najít jedince až s 9 chromozomy X, u *P. capitatus* s 6 X.

V nedávné studii jsme analyzovali karyotyp recentně se šířící štěnice domácí v České republice a v dalších evropských státech (Sadílek a kol. 2013). Ve vzorcích z 57 lokalit jsme našli celkem 12 odlišných karyotypů. Všichni zkoumaní jedinci

vykazovali shodně 26 autozomů, ale variabilita v počtu pohlavních chromozomů X byla enormní. Po konfrontaci samčích karyotypů s karyotypy samic vycházel početně vždy pouze jeden pohlavní chromozom samců jako Y. Variabilita počtu chromozomů byla tedy způsobena chromozomy X. Zaznamenali jsme jedince s 2–20 chromozomy X (2n samců od 29, X_1X_2Y do 47, $X_{1-20}Y$, viz obr. 7–9). Základní karyotyp s nejnižším počtem chromozomů, 2n samců = 29, X_1X_2Y (obr. 7), byl však stále nejrozšířenější a vyskytoval se u 44 % jedinců (51 kusů) na více než polovině sledovaných lokalit.

Nejvyšší počty chromozomů X jsme našli pouze na lokalitách, kde se vyskytovaly různé varianty karyotypu. Ve sběru ze slovenské Trnavy bylo zjištěno nejvíce variant – neuvěřitelných pět. Žily zde štěnice se 4, 7, 8, 9 a 10 chromozomy X. V pěti takto polymorfních populacích byli zaznamenáni i jedinci s tzv. mozaicismem, což je jev, při němž se různé buňky v těle liší karyotypem, např. počtem chromozomů. Předpokládáme, že zvýšení chromozomové variability u štěnice domácí může vzniknout i křížením jedinců s odlišnými karyotypy. Sekundární smíšené populace jedinců s různými počty chromozomů zpravidla produkují potomstvo se širší škálou karyotypů, než se vyskytovala u rodičovských populací. Takový scénář u parazita šířeného především migrujícími lidmi si lze snadno představit, např. v ubytovnách, kam nocležníci zanesou různé, často geograficky vzdálené populace. Variabilita počtu chromozomů může být spojena s nepravidelným rozchodem chromozomů během buněčného dělení. Jak bylo zmíněno u mohutnatek, může jít o důsledek fragmentace pohlavních chromozomů. Vedle fragmentace se mohou odehrávat i duplikace vzniklých fragmentů, o čemž vypovídají hybridizační pokusy.

Tvorba chromozomových fragmentů v karyotypu štěnice souvisí s holokinetickým charakterem jejich chromozomů, v úvahu připadá i nějaký mechanismus usnadňující fragmentaci chromozomu X. U jedinců s extrémními počty chromozomů X musí docházet téměř s jistotou v meióze k problémům při správném rozchodu chromozomů do dceřiných jader. Následně jsou produkovány výrazně nevyvážené gamety, což může snižovat životaschopnost potomstva daného jedince. Tato hypotéza by vysvětlovala snižující se počet zachycených jedinců s vysokými počty chromozomů X. Rovněž není pravděpodobné, že by karyotypy s nejvyššími počty chromozomů X vznikaly vždy „od nuly“, tedy fragmentací výchozího systému X_1X_2Y .

Proč a jak jsou chromozomy štěnic variabilní?

Nově vzniklé chromozomy štěnice domácí se chovají v meióze stejně jako původní pohlavní chromozomy systému X_1X_2Y . Je velice komplikované spolehlivě prokázat, z jakého chromozomu byly odštěpeny, protože chromozomy *C. lectularius* se od sebe morfologicky téměř neliší a většinu meiózy mají formu kompaktních hyperspiralizovaných kulovitých útvarů. V mitóze zase vůbec nelze odlišit autozomy od pohlavních chromozomů.

Alternativní hypotéza vysvětlující výraznou variabilitu počtu chromozomů u štěnic pracuje s tzv. chromozomy B, někdy označovanými jako „genomový parazit“: „Většinou jen zaměštnávají dělicí aparát buňky bez většího přínosu pro organismus. Bývají tvořeny heterochromatinem a během dělení jsou mezi dceřinými jádry rozdělovány nerovnoměrně. U některých druhů čeledi Cimicidae se skutečně vyskytují. Podle našich studií však nadpočetné pohlavní chromozomy štěnice domácí chromozomům B spíše neodpovídají.“

Nejpravděpodobnějším vysvětlením vzniku nadpočetných chromozomů štěnice domácí tedy zůstává fragmentace původních pohlavních chromozomů X, případně nondisjunkce (chybné rozchody chromozomů nebo chromatid) a následně hybridizace. Jako mechanismus vzniku nových pohlavních chromozomů u štěnic byla fragmentace navržena již v 60. a 70. letech 20. stol. Rozdělení původního jedinečného chromozomu X na dva fragmenty (X_1 , X_2) se pravděpodobně pevně zafixovalo a v současných populacích štěnice domácí se pouze jeden chromozom X již vůbec nevyskytuje. Stále ovšem existuje mnoho nejasností ohledně vzniku chromozomových fragmentů. Nevíme, zda k rozpadům dochází přednostně v určitých místech mateřských chromozomů X_1 a X_2 a zda nezávisle vznikají vždy „stejně“ fragmenty. Nejasné rovněž zůstává, jak se fragmenty chromozomu X chovají při křížení jedinců s jejich různým počtem. Předběžné výsledky naší studie, ve které u štěnic se známým karyotypem zjišťujeme obsah DNA v jádře průtokovou cytometrií, naznačují velkou variabilitu v obsahu DNA, na níž se podílí zřejmě více chromozomových přestaveb (fragmentace, delece i duplikace).

Štěnice na celém světě byly vystavovány tlaku všech možných insekticidů po mnoho desetiletí a potenciální mutagenní efekty různých silně toxických sloučenin mohly mít vliv i na zvýšení náchylnosti chromozomů k přestavbám nebo zvýšené fragmentaci. Důkazem mohou být četné nálezy fragmentů pohlavních chromozomů v synantropních populacích štěnice domácí a současně absence takto vysoké variability u druhů štěnic sajících na

netopýrech a ptácích. Jistá variabilita v počtu pohlavních chromozomů však byla zaznamenána u netopýřích štěnic *Cimex pipistrelli* a zmíněného rodu *Paracimex*, které žijí volně v přírodě a insekticidům nejsou vystavovány přímo. Pohlavní chromozomy štěnic tedy vykazují i určitý přirozený sklon k fragmentaci. Způsob šíření štěnic může dále zvýraznit efekt zakladatele, kdy jediná spářená samice může dát vzniknout celé nové populaci, od začátku karyotypově různorodé. Obdobně může působit i tzv. efekt hrdla láhve při přežití např. jediné štěnice s odvozeným karyotypem a její přenos či opětovné namnožení.

Závěr

O vztahu mezi distribucí fragmentů pohlavních chromozomů a neobvyklými znaky reprodukční biologie štěnice můžeme zatím jen spekulovat. Lze předpokládat snížení životaschopnosti nebo reprodukční schopnosti jedinců s vysokými počty fragmentů chromozomů X, což může ovlivnit i dynamiku populací štěnic. Hlubší poznatky v této oblasti jsou tradičními cytogenetickými metodami nedosažitelné, v tomto bodě musíme sáhnout po metodách molekulární genetiky.

Současná celosvětová expanze štěnic jistě zvyšuje potřebu jejich komplexního studia, zejména kvůli zjištění, že se skladba chromozomů může vyvíjet rychleji než vlastní sekvence DNA. Výzkum této chromozomové variability, která je pravděpodobně spojena s nepravidelnostmi při rozchodu chromozomů během dělení, poskytne vhled do reprodukční biologie a populační dynamiky, a tím přispěje ke kontrole tohoto obtížného parazita.

Výzkum vznikl za finanční podpory projektu Grantové agentury UK č. 277815/2015.

Použitou literaturu uvádíme na webovém stránce Živy.

10 Štěnice tropická (*C. hemipterus*) žije v tropických oblastech celého světa a jejím obligátním hostitelem je člověk. Se štěnicí domácí se nevyskytuje současně, protože oba druhy mají různé teplotní nároky. Snímky D. Sadílka

