

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Barbora Černá

Vývoj levo-pravé asymetrie mozku obratlovců
Development of left-right asymmetry of the vertebrate brain

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.

Praha, 2023

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 11.12.2023

Barbora Černá

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Vladimíru Soukupovi, Ph.D. za veškerou pomoc, cenné připomínky, podněty, odborné vedení a za trpělivost při tvorbě mé bakalářské práce.

Abstrakt

Levo-pravá asymetrie vnitřního uspořádání jedince se vyskytuje napříč živočišnou říší a jedná se o hluboce konzervovaný znak. Tato vnitřní asymetrie se týká různých orgánových systémů, včetně mozku. Levo-pravou asymetrii mozku u obratlovců můžeme nalézt ve velikosti, tvaru nebo neurální lateralizaci mozkových oblastí. Vývojový proces, který tyto asymetrie řídí, zahrnuje složité interakce mezi genetickými, epigenetickými a environmentálními faktory. Porozumění těmto mechanismům a jejich vzájemný vztah je pro další studium tohoto fenoménu klíčový. Základním modelovým organismem pro zkoumání mozkové asymetrie je danio pruhované (*Danio rerio*), které je využito pro demonstraci morfologické asymetrie epithalamu a vývoj jejího ustanovení od prvotního narušení symetrie v těle až po funkční asymetrii v mozku s důrazem na význam signální dráhy Nodal při její regulaci. Pochopení vývoje asymetrie mozku a jeho regulace u obratlovců může přinést vhled do neurologických poruch spojených s tímto fenoménem a přispět k odhalení evoluční historie mozku, jeho schopnosti adaptace a reakcí na různá prostředí.

Klíčová slova

Levo-pravá asymetrie, mozek, Nodal, epithalamus, danio pruhované, LRO

Abstract

The left-right asymmetry of the internal organization of an individual occurs across the animal kingdom and represents a deeply conserved trait. This internal asymmetry involves various organ systems, including the brain. Left-right asymmetry in the brains of vertebrates can be found in the size, shape, or neural lateralization of brain regions. The developmental process governing these asymmetries involves complex interactions between genetic, epigenetic, and environmental factors. Understanding these mechanisms and their interrelationships is crucial for further studying this phenomenon. The zebrafish (*Danio rerio*) serves as a fundamental model organism for investigating brain asymmetry, demonstrating morphological asymmetry of the epithalamus and the development of its establishment from initial symmetry disruption in the body to functional asymmetry in the brain, with an emphasis on the role of the Nodal signaling pathway in regulating this asymmetry. Understanding the development of brain asymmetry and its regulation in vertebrates may provide insight into neurological disorders associated with this phenomenon and contribute to uncovering the evolutionary history of the brain, its adaptive capabilities, and responses to different environments.

Key words

Left-right asymmetry, brain, Nodal, epithalamus, danio rerio, LRO

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Ustanovení levo-pravé asymetrie těla v průběhu ontogeneze.....	3
2.1 Narušení asymetrie na úrovni blastomer.....	4
2.2 Narušení bilaterální symetrie - ustanovení levostranného toku v LRO.....	4
2.3 Interpretace prvotního narušení symetrie.....	6
2.4 Asymetrická genová exprese.....	8
3. Levo-pravá asymetrie mozku aneb převedení asymetrické genové exprese do lateralizované morfologie orgánů.....	10
4. Vývoj levo-pravé asymetrie mozku u dania pruhovaného.....	12
4.1 FGF (fibroblast growth factor) dráha.....	12
4.2 Nodální dráha.....	12
4.2 Dráhy Notch a Wnt/beta catenin.....	14
5. Asymetrie mozku v evolučním kontextu.....	17
5.1 Evoluční výhody lateralizace.....	17
5.2 Ustanovení levo-pravé asymetrie mozku v evoluci.....	19
6. Další faktory ovlivňující levo-pravou asymetrii mozku.....	21
6.1 Environmentální faktory.....	21
6.2 Epigenetické faktory.....	22
Závěr.....	24
Seznam zkratk.....	25
Reference.....	27

1. Úvod

Ačkoliv obratlovci patří mezi Bilateralia – jsou tedy z vnějšku dvoustranně souměrní, jejich významnou charakteristikou ale také je, že pod symetrickým vnějším pláštěm se skrývá fyzická levo-pravá asymetrie velké části vnitřních struktur. Tento fenomén je základní a konzervovanou vlastností a je pozorován u mnoha rozdílných druhů živočichů od hmyzu po savce. Může se vyskytovat v různých formách – jedná se o rozdíly ve velikosti, tvaru, stavbě, funkci či umístění jednotlivých orgánů (např. asymetrie umístění i tvaru srdce, plic, žaludku či jater (Tabin 2006)). Asymetrie se vyskytuje i u na první pohled bilaterálně uspořádaných orgánů jako je např. mozek nebo mozeček (Varlet a Robertson 1997).

Jedním z nejzajímavějších příkladů asymetrie u obratlovců je levo-pravá asymetrie mozku projevující se rozdílným tvarem a velikostí mozkových oblastí či lateralizací neuronálních pochodů včetně odvozeného chování (Sha et al. 2021). Tato strukturální kompartmentalizace umožňuje specializované zpracování různých typů informací (jazyk, prostorové vnímání nebo emoční zpracování) a předpokládá se, že poskytuje evoluční výhody, jako je zvýšená účinnost a flexibilita neurálního zpracování a přenosu (Güntürkün et al. 2020).

Ontogenetický vývoj asymetrie mozku u obratlovců je komplexní a dynamický proces, který zahrnuje interakce mezi genetickými, epigenetickými a environmentálními faktory (Güntürkün a Ocklenburg 2017). Přesné mechanismy, které jsou základem tohoto procesu ještě nejsou plně pochopeny. Studie na různých zvířecích modelech již však poskytly vhled do role signálních drah, genů a hormonů při utváření funkční a strukturální asymetrie mozku. Jako velmi dobrý model se ukázala ryba danio pruhoaná (*Danio rerio*), jakožto obratlovec, který je snadno dostupný pro experimentální manipulace a pozorování. Významné je speciálně studium morfologické asymetrie epithalamu dania (Facchin et al. 2008), které bych se ráda v této práci blíže věnovala.

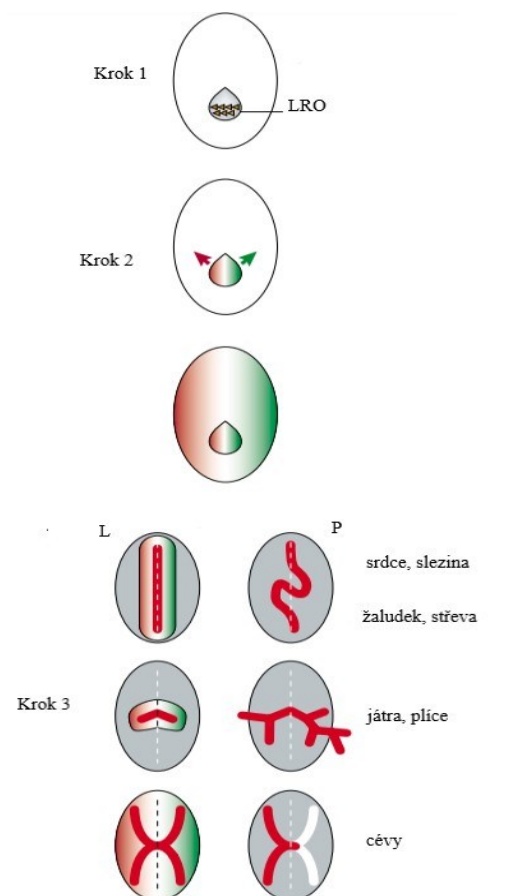
Studium asymetrie mozku u obratlovců je důležité například pro pochopení toho, jak mozek zpracovává informace a jak tyto informace následně ovlivňují chování (Lin a Burdine 2005). Porozumění vývoji a regulaci asymetrie mozku může pomoci lépe pochopit neurologické poruchy spojené s poruchami asymetrie, jako je například dyslexie, schizofrenie nebo autismus. Zároveň je klíčové pro zmapování evoluční historie mozku a toho, jak se přizpůsobil různým prostředím a ekologickým tlakům (Gazzaniga 2000). Logicky je tak zkoumání vývoje (fylogenetického i ontogenetického) asymetrie mozku oblastí vysoce aktivního výzkumu, který se snaží porozumět původu a diverzifikaci tohoto znaku, a to hlavně u obratlovců, jejichž

chování je extrapolovatelné na situaci u člověka. Dosavadní výzkum naznačuje, že vývoj asymetrie mozku je úzce spojen s taxonomickou klasifikací, přičemž některé skupiny obratlovců vykazují výraznější asymetrii než jiné (Hodos a Butler 1997).

Práce cílí na popis mechanismu ustanovení levo-pravé asymetrie těla v časných embryonálních stadiích a na ustanovení asymetrie mozku, především epithalamu. Dále si klade za cíl zhodnotit roli signálních drah regulujících tyto asymetrie, jejichž středobodem je Nodal signální dráha. V rámci této práce bych se dále ráda věnovala výzkumu interakcí mezi genetickými, epigenetickými a environmentálními faktory, které řídí a ovlivňují levo-pravou asymetrii mozku. Také bych chtěla provést porovnání asymetrických charakteristik mozku u ryby dania pruhovaného a dalších druhů obratlovců, které nám umožní lépe pochopit evoluční historii a adaptivní výhody asymetrie mozku. Zjištění, zda existují rozdíly v asymetrii mezi různými skupinami obratlovců, nám může poskytnout důležité informace o vztahu mezi strukturální asymetrií mozku a specifickými adaptacemi jednotlivých druhů na jejich životní prostředí.

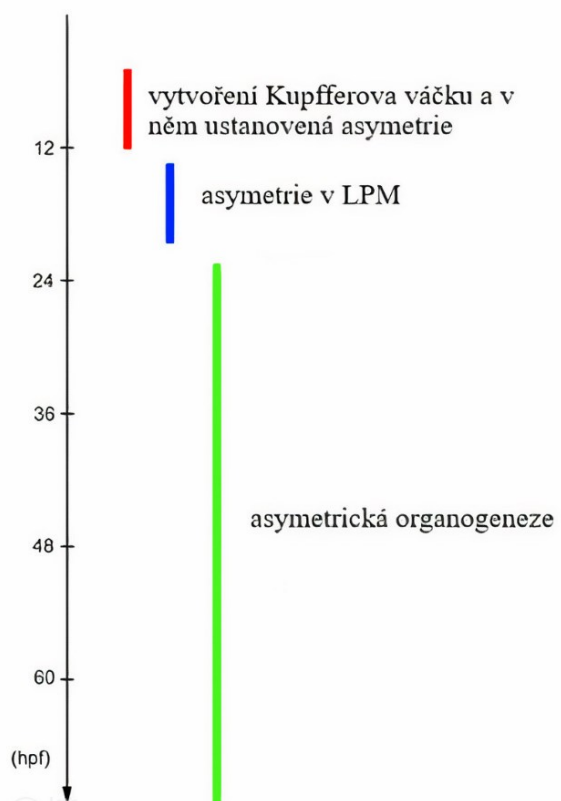
2. Ustanovení levo-pravé asymetrie těla v průběhu ontogeneze

Během ontogeneze embrya dochází v různých fázích vývoje k ustavení tří různých tělních os. Jako první se tvoří osa antero-posteriorní (předo-zadní), za ní následuje dorzálně-ventrální osa a jako poslední se utváří levo-pravá osa, která určuje pozdější levo-pravou asymetrii těla (Hirokawa et al. 2006, Stern 2006). Proces vzniku této asymetrie těla v embryu probíhá ve třech krocích (viz Obrázek 1). Nejprve dochází k narušení bilaterální asymetrie v levo-pravém organizátoru (LRO), tedy vytvoření levo-pravé osy (v konzistentní orientaci vůči ostatním osám embrya) – krok 1. Druhým krokem je asymetrická genová exprese - různé vzorce genové exprese se spouštějí na pravé a levé straně embrya. Nakonec je tato asymetrická genová exprese převedena do LPM (LPM = *lateral plate mesoderm*) a poté do lateralizované morfologie orgánů – krok 3 (Sha et al. 2021, Matsui a Bessho 2012).



Obrázek 1: Tři kroky ustanovení asymetrie organismu
V prvním kroku dochází k prvotnímu narušení symetrie levostranným tokem tekutiny v LRO (=left-right organizer). Ve druhém kroku se asymetrie v LRO přenáší do asymetrické genové exprese, kterou je asymetrie přenesena do LPM (=lateral plate mesoderm). Ve třetím kroku je asymetrická genová exprese převedena do lateralizované asymetrie orgánů.

Převzato a upraveno podle: Hamada et al. (2002)



Obrázek 2: Časová osa ustanovení asymetrie dania pruhovaného

Levo-pravý organizátor – u dania Kupferův váček (KV) se vytváří do 12 hpf (=12 hodin po oplození) a generuje jednostranné proudění tekutiny, které naruší levo-pravou symetrii v okolí KV. Asymetrické signály se následně přenášejí z KV do LPM (=lateral plate mesoderm). Od 24 hpf nastává asymetrická organogeneze.

Převzato a upraveno podle: Matsui a Bessho (2012)

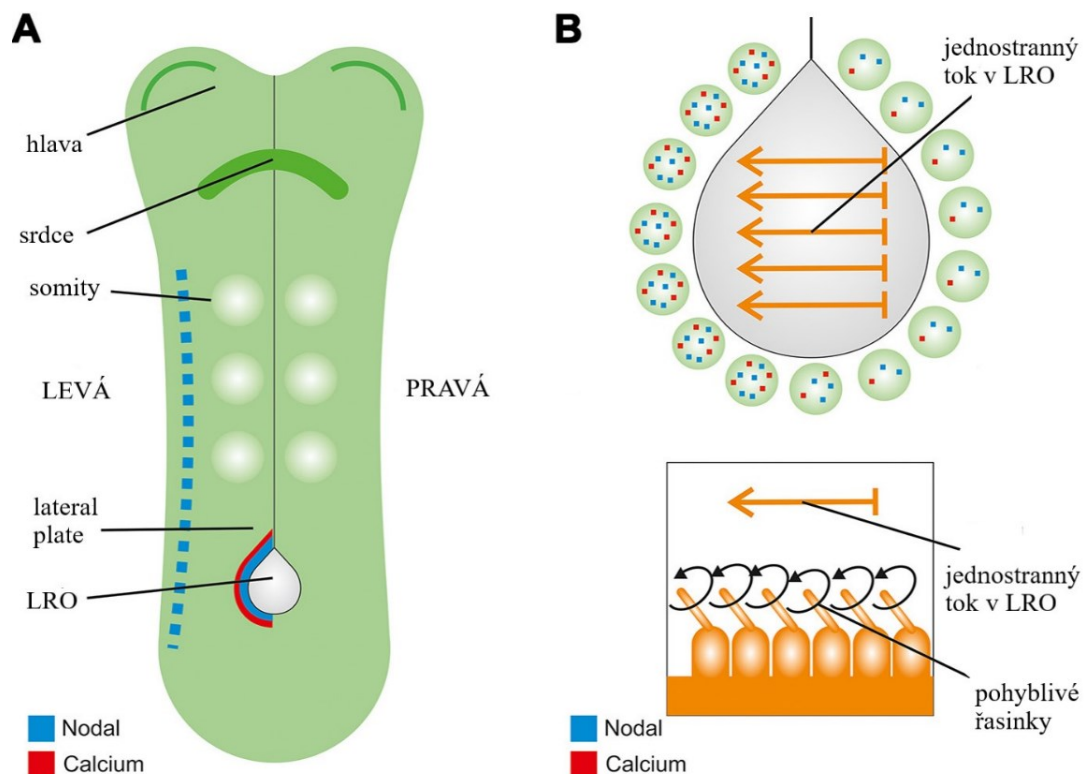
2.1 Narušení asymetrie na úrovni blastomer

Někdy se rozlišuje i “krok 0“ – levo-pravá asymetrie embrya ustanovená již na úrovni blastomer (Levin a Palmer 2007). Jde o asymetrii v orientaci transportu klíčových molekul uvnitř buněk, což nakonec vytváří rozdíl mezi levou a pravou stranou embrya. mRNA a proteiny iontových transportérů pocházející z vajíčka se v nově vytvořeném embryu asymetricky rozdělují díky aktivitě intracelulárních motorových proteinů. Poprvé bylo toto prokázáno u drápatky *Xenopus laevis* - mRNA H^+/K^+ -ATPáza je v jednobuněčném embryu exprimována symetricky, ale asymetricky se lokalizuje během prvních dvou buněčných dělení, což dokládá vznik prvotní molekulární asymetrie do dvou hodin po oplození (Levin et al. 2002).

2.2 Narušení bilaterální symetrie - ustanovení levostranného toku v LRO

Původně oboustranně symetrické embryo se stává morfologicky asymetrickým během raných stadií vývoje (u každého druhu je to v jiném okamžiku (Little a Norris, 2021) - časová osa ustanovení asymetrie u dania viz Obrázek 2). K zásadnímu narušení bilaterální symetrie dochází v přechodné mediální struktuře označované jako uzel (nod) nebo levo-pravý organizátor (anglicky *left-right organiser* - LRO). LRO se objevuje v zadní části budoucího notochordu během tvorby somitů (viz Obrázek 3A) a vytváří charakteristickou dutinu s řasinkami obrácenými do této dutiny (viz Obrázek 3B). Jde převážně o typ pohyblivých řasinek 9+0, které mají devět dubletových mikrotubulů s dyneinovými rameny, ale postrádají centrální mikrotubuly a radiální paprsky (Odate et al. 2016). Na předním konci je uzel kontinuální s notochordem, přestože jsou tyto buňky funkčně odlišné (Little a Norris, 2021). Ačkoli jsou LRO jednotlivých druhů obratlovců strukturálně různorodé – u myši jde o tzv. ventrální uzel, u kuřecího embrya se jedná o Hensenův uzel, u drápatky se nalézá GRP (GRP = *gastrocoel roof plate*), u dania se LRO nazývá Kupfferův váček (Hamada 2020, Amack 2014), zdá se, že logika narušení levo-pravé asymetrie je u mnoha obratlovců sdílená (Blum et al. 2009). V dutině LRO pomocí cilií (viz Obrázek 4), které rotují (to je podmíněné mikrotubuly s dyneinovými rameny (Hirokawa et al. 2006)), vzniká proud extracelulární tekutiny, který je asymetricky levostranný – pohybuje se tedy proti směru hodinových ručiček. Lineární směrové proudění vznikne, pokud jsou rotační osy řasinek nakloněny dozadu. Takový náklon způsobí, že efektivní tah doleva bude mnohem účinnější než obnovovací tah doprava, protože ten musí přesouvat tekutinu mnohem blíže k povrchu embrya, kde je vyšší viskozita. Pokud by řasinky nakloněné nebyly, tvořil by se symetrický vír. Jejich nakloněním je pohyb elipsoidní, důsledkem je tedy jednostranný tok a to doleva (Cartwright et al. 2004; Hashimoto et al. 2010;

Nonaka et al. 2005; Song et al. 2010). Směrový tok tekutiny proti směru hodinových ručiček způsobuje zvýšení koncentrace intracelulárního Ca^{2+} v buňkách lokalizovaných na levé straně LRO – to je nejranější asymetrickou molekulární událostí v LRO. Zvýšené množství Ca^{2+} indukuje fosforylaci Ca^{2+} /CaM-dependentní proteinkinázy (u daniá, která aktivuje jak uvolňování Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (ER), tak extracelulární influx Ca^{2+} - jde tedy o pozitivní zpětnovazebnou smyčku (Francescato et al. 2010). Jednostranný tok také způsobuje vyšší expresi proteinu Nodal v buňkách LRO na levé straně (podrobněji dále). Tyto dva procesy, způsobené směrovostí toku uvnitř LRO, vedou k aktivaci signální kaskády Nodal v levém, ale nikoliv v pravém LPM - tedy k asymetrické expresi genů na levé a pravé straně (Shiratori a Hamada 2014) – viz. kapitola 2.3.

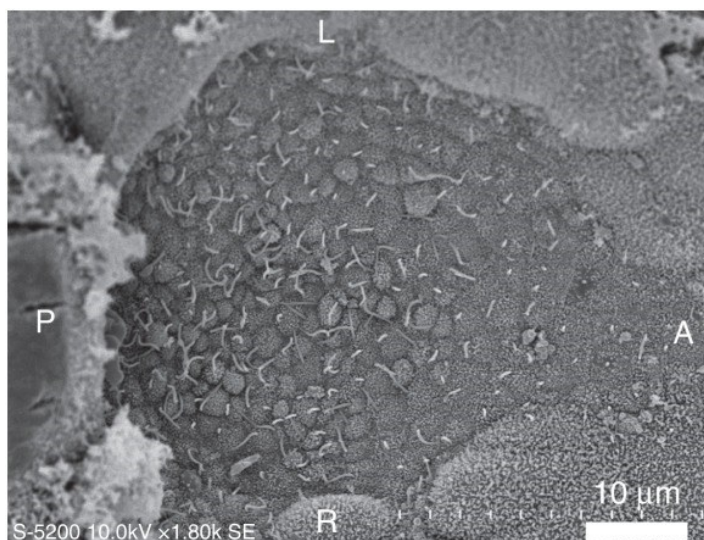


Obrázek 3: Schéma ustanovení asymetrie

Část A - Schéma embrya demonstrující asymetrickou expresi Nodalu na levé straně

Část B - Schéma ukazující, že LRO (=left-right organizer) je vystlaný pohyblivými řasinkami, které vyčnívají do komory naplněné tekutinou. Tyto řasinky rotují, což vede k proudění doleva, které vede k silnějšímu přítoku vápníku do buněk na levé straně než na pravé straně LRO a také k vyšší expresi Nodalu.

Převzato a upraveno podle: Güntürkün et al. (2020)



Obrázek 4: Řasinky v LRO myšičího embrya
Měřitko 10 μm . A, přední část; P, zadní část; L, levá část; R, pravá část

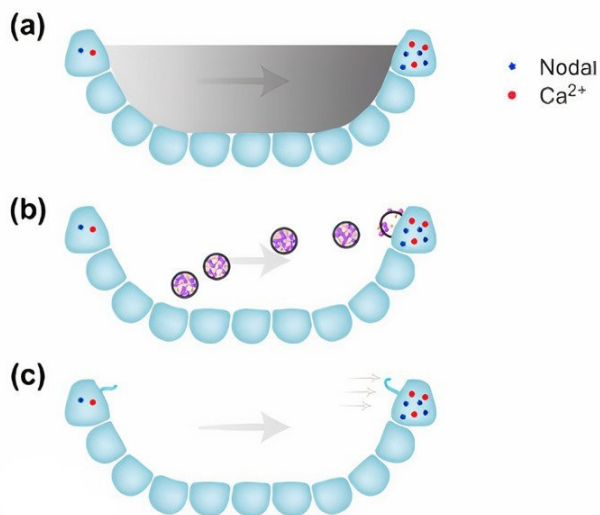
Převzato z: Shinohara a Hamada (2017)

2.3 Interpretace prvotního narušení symetrie

Stále není úplně jasné, jak je levostranný řasinkami zprostředkovaný tok, tedy prvotní narušení symetrie v LRO, interpretován. Pro vysvětlení tohoto fenoménu byly formulovány tři hypotézy: morfogenová, nodálně-vezikulární (NVP = *nodal vesicular parcels*) a mechanosenzorická (viz Obrázek 5).

- a) **Morfogenový model** předpokládá, že směrový proud slouží k jednostranné distribuci morfogenu, čímž vzniká jeho gradient, který dále spouští levostrannou signalizační dráhu. Tento model by ale fungoval pravděpodobně pouze pro molekuly o velikosti 20-40 kDa, u menších by byla difuzí rychle asymetrie zrušena. Tento velikostní rozsah však zahrnuje mnoho známých signálních molekul (Nonaka et al. 1998).
- b) **Hypotéza NVP** navazuje na morfogenový model, ale předpokládá, že signální molekuly jsou přenášeny ve vezikulech, které jsou tokem (mechanicky ciliemi či silou proudu) rozbíjeny v levé části uzlu a tím je morfogen specificky dopravován na levou stranu. Přímo v Kupfferově váčku dania byla prokázána tělíska, která by mohla být podobná NVP (Sampaio et al. 2014). Samotný tok ani cilie ale, zdá se, nemají tolik energie, aby dokázaly vezikuly rozbít, muselo by jít o jiný - aktivní, energií poháněný mechanismus (Cartwright et al. 2019; Tanaka et al. 2005).
- c) Třetím navrženým mechanismem a zdá se, že nejpravděpodobnějším (Djenoune et al. 2023; Katoh et al. 2023), je **mechanosenzorický model** (viz Obrázek 6). Jeho principem je existence dvou různých typů řasinek – pohyblivé řasinky v centrální části LRO, které svou jednostrannou rotací vytváří směrové proudění (Shinohara a Hamada 2017), a pasivní řasinky, které fungují jako senzory tohoto toku - reagují na

mechanickou sílu toku (Katoh et al. 2023). Buňkám nesoucím tyto nepohyblivé řasinky se říká korunkové buňky. Tyto pasivní řasinky vyžadují opakovanou a konzistentní mechanickou stimulaci, než je přenesen Ca^{2+} signál do buňky a tím interpretován mechanický stimul. Tato schopnost umožňuje rozlišovat mezi skutečnými konzistentními a falešnými stimuly odfiltrováním vnějšího biologického šumu ve tkáních vystavených velkým biomechanickým silám. To zahrnuje směrový tok extracelulární tekutiny i nesměrové cytoskeletální pohyby (Djenoune et al. 2023).



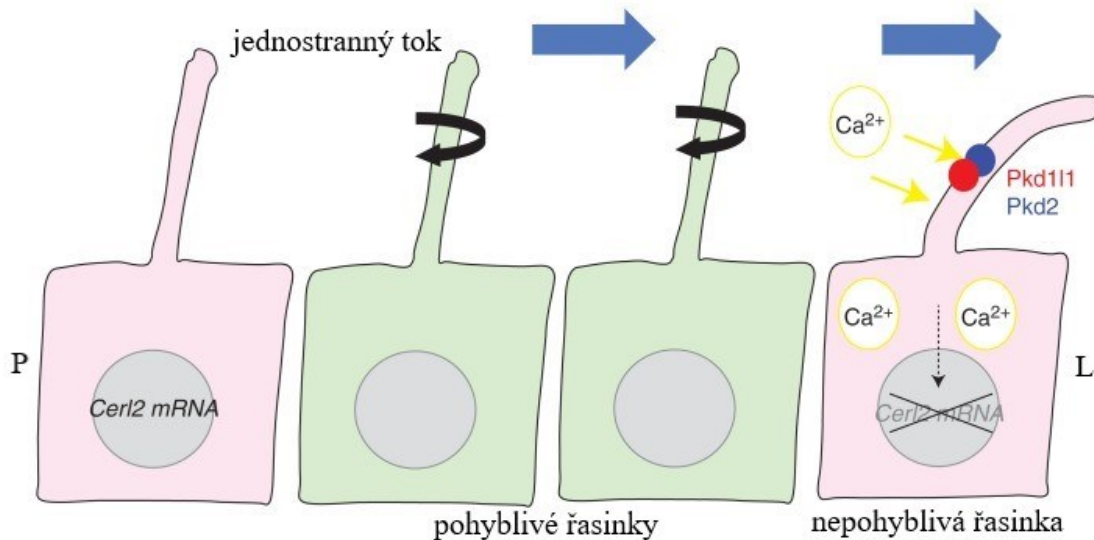
Obrázek 5: *Teorie interpretace jednostranného toku řasinkami*

(a) *Morfogenní model* - předpokládá, že morfogen produkovaný v LRO se v reakci na tok asymetricky lokalizuje mezi levou a pravou stranou (znázorněno šedým gradientem).

(b) *Hypotéza NVP* (NVP=nodal vesicular parcels) je založená na předpokladu, že vezikuly obsahující morfogen jsou jednostranným tokem unášeny doleva a rozbíjejí se při kontaktu s řasinkami na levé straně uzlu. Tím se morfogen uvnitř NVP lokalizuje asymetricky.

(c) *Mechanosenzorický model* tvrdí, že samotné proudění vytvořené pohyblivými řasinkami je detekováno na levé straně uzlu pomocí nepohyblivých řasinek a signál Ca^{2+} ionty je přenesen do buňky a tím je signál přenesen

Převzato z: Norris (2012)



Obrázek 6: *Mechanosenzorický model*

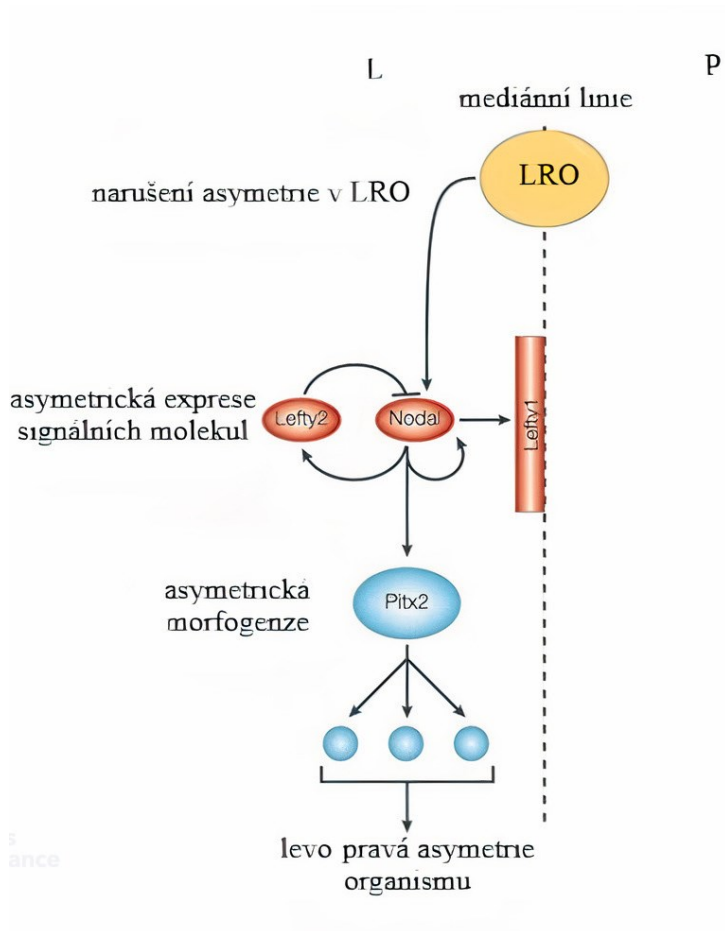
Na obrázku jsou znázorněny dva typy řasinek v LRO - pohyblivé řasinky (zelené) umístěné v centrální oblasti uzlu generují tok, zatímco nepohyblivé řasinky umístěné periferně (růžové) tok snímají. Detekce jednostranného toku probíhá za spolupráce komplexu Pkd111-Pkd2 s Ca^{2+} kanálem. Signály zprostředkované tokem vedou k degradaci mRNA Cerl2. Cerl2 je antagonistou Nodalu, inhibuje jeho činnost. Exprese Cerl2 je zpočátku symetrická, ale působením levostranného toku se stává asymetrickou, v senzoryckých buňkách nesoucích nepohyblivé řasinky na levé straně tedy podléhá degradaci a nemůže tedy inhibovat protein Nodal.

Převzato a upraveno podle: Shinohara and Hamada (2017)

2.4 Asymetrická genová exprese

Ať už platí kterákoliv z výše uvedených hypotéz, je evidentní, že důsledkem jednostranného toku v LRO dochází k asymetrické regulaci genové exprese, a to s využitím vysoce konzervovaných signalizačních drah.

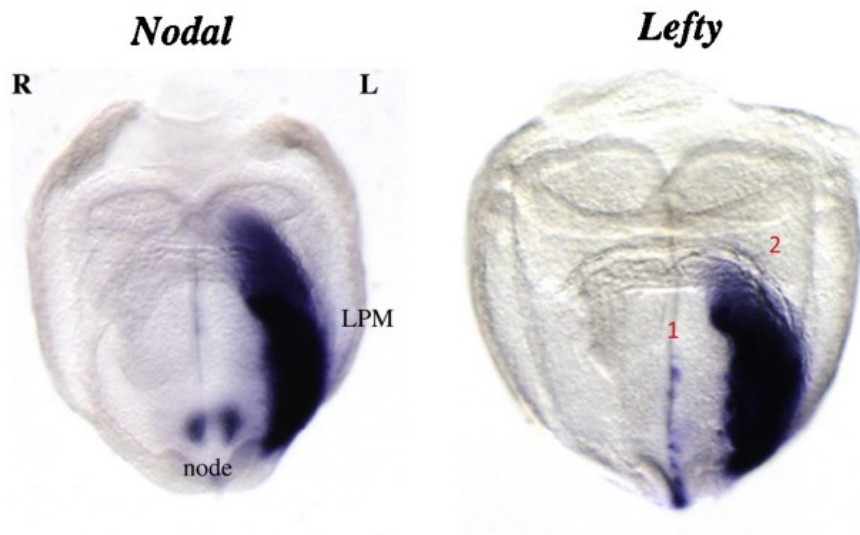
Tato asymetrie signálních molekul vytvořená v okolí organizátoru je přenesena do mezodermu laterální ploténky (LPM = *lateral plate mesoderm*) – tím se asymetrie ustanovená v LRO rozšíří do zbytku těla. Aktivní protein Nodal (ligand superrodiny transformujícího růstového faktoru beta - TGF β), pravděpodobně se jedná o heterodimer Nodal-Gdf1, produkovaný v korunkových buňkách na levé straně je transportován do levého LPM, kde přímo aktivuje expresi Nodal (Hamada 2020). Aktivita molekuly Nodal se šíří po celém levém mezodermu laterální ploténky, ale zůstává nepřítomná na pravé straně. Je tomu tak díky působení antagonistických proteinů ze skupiny Lefty, které patří také do superrodiny TGF β (Shiratori a Hamada 2014). Levostranná signalizace prostřednictvím Nodal indukuje expresi Lefty. Lefty pak difunduje přes mediální linii na pravou stranu embrya a inhibuje Nodal signalizaci na této straně. Tato smyčka negativní zpětné vazby zajišťuje, že signalizace v LPM je aktivní pouze na jedné straně embrya, což podporuje vytvoření levo-pravé asymetrie (Juan a Hamada 2001). Nodal indukuje levostrannou expresi sebe sama a také transkripčního faktoru Pitx2, který je transkripčním efektoem následného působení Nodalu a tím i hlavním mediátorem pro některé aspekty asymetrické levostranné organogeneze (v jeho nepřítomnosti tedy dochází u bilaterálních orgánů k pravé izomerii, některé morfologické asymetrie však nejsou ovlivněny ztrátou Pitx2 – např. srdeční smyčka či strannost žaludku). Jeho levostranná exprese přetrvává mnohem déle než exprese Nodal nebo Lefty (Hamada 2020) a ovlivňuje tedy asymetrickou organogenezi. Co se týká konkrétně mozku, kterému se chci věnovat dále, stále není jasné, jak přesně je asymetrie z LPM do mozku přenesena. Je ale každopádně prokázáno, že u danií je aktivace Nodal signalizace v LPM nutná pro pozdější přechodnou expresi Nodalu v levém epithalamu (Long et al. 2003). Naopak u lidského nebo hlodavčího mozku tato spojitost není, protože lidský ani hlodavčí mozek signalizací Nodal ovlivněn není (McManus et al. 2004).



Obrázek 7: **Asymetrická exprese vedoucí k morfologické asymetrii u myši**

K narušení symetrie dochází v LRO (=left-right organizer) jednostranným tokem tekutiny, která má za následek jednostrannou upregulaci proteinu Nodal. Ten difunduje do LPM (=lateral plate mesoderm), kde se zapojuje do mechanismu zpětné vazby - jednostranná exprese proteinu Nodal. Vlevo indukuje expresi Lefty2, a zároveň sebe sama. Zároveň aktivuje Pitx2, což je transkripční faktor a hlavní mediátor pro některé aspekty asymetrické levostranné organogeneze. K případnému nežádoucímu přesunu aktivity Nodal dráhy na pravou stranu LPM je zamezeno díky vyšší difúzní rychlosti Lefty2, který omezuje aktivitu Nodal ligandu, a také díky přítomnosti Lefty1, který je exprimován na mediální linii.

Převzato a upraveno podle: Hamada et al. (2002)



Obrázek 8: **Levo-pravá asymetrická exprese genu Nodal a Lefty**

In situ hybridizace ukazuje LR asymetrickou expresi Nodal a Lefty v E8.0 myším embryu. Oba faktory jsou exprimovány v LPM na levé straně, zatímco exprese Lefty je také viditelná na mediální linii. Ve skutečnosti existují dva geny Lefty, přičemž Lefty2 je přednostně exprimován v LPM a Lefty1 v mediální linii. Nodal je viditelný na obou stranách v LRO, na levé straně výrazněji.

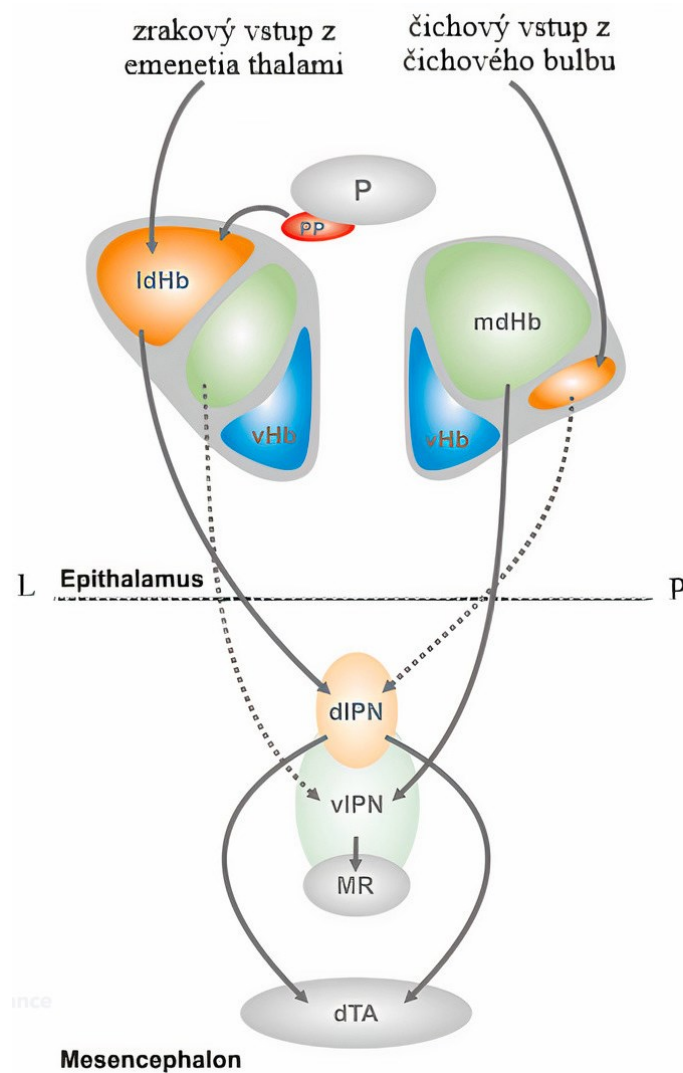
Převzato a upraveno podle: Shiratori a Hamada (2014)

3. Levo-pravá asymetrie mozku aneb převedení asymetrické genové exprese do lateralizované morfologie orgánů

Nejvíce poznatků o vývoji asymetrie mozku pochází ze studií dania pruhovaného, které vykazují výraznou anatomickou asymetrii, takže se etablovalo jako mimořádně vhodný model pro studium asymetrie centrální nervové soustavy. Danio bylo pro tyto experimenty vybráno díky malému a průhlednému tělu, rychlému embryonálnímu vývoji, efektivním genetickým manipulacím (Kalueff et al. 2014) a snadné identifikaci embryí s normální a opačnou tělní asymetrií (Barth et al. 2005). Nejprozkoumanější strukturální asymetrií mozku dania je asymetrie epithalamu (viz Obrázek 9), která je konzervovaná u velkého množství obratlovců, a proto slouží jako vhodný příklad pro ilustraci konkrétní mozkové asymetrie.

Epithalamus je dorzální součástí mezimozku obratlovců a je tvořen bilaterálními habenulárními jádry a nepárovým pineálním komplexem (Concha a Wilson 2001). Pineální komplex se skládá ze dvou hlavních struktur: z epifýzy (ta je konzervovaná u všech obratlovců), fotosenzitivní žlázy, která se podílí na produkci melatoninu a na regulaci cirkadiálních rytmů (Gamse et al. 2001), a z parapineálního orgánu (ten se vyskytuje pouze u některých ryb, obojživelníků a plazů) (Concha a Wilson 2001; Gamse et al. 2003; Gregorek et al. 1977). Epifýza žádnou morfologickou asymetrii nevytváří. Naopak jak habenulární jádra, tak parapineální orgán asymetrické jsou (Gamse et al. 2003). Habenuly jsou součástí převodního systému spojujícího limbický přední mozek s interpedunkulárními jádry (IPN) ve ventrálním středním mozku, tegmentárních jádrech a raphe nucleus zadního mozku (Bianco a Wilson 2009). Jsou složeny ze tří podjader na každé straně: ventrálního (vHb), laterálně-dorzálního (ldHb) a mediálně-dorzálního (mdHb). Ventrální habenula je podobně velká na obou stranách a neliší se ani v projekčních drahách, dorsální habenuly se ale mezi pravou a levou stranou liší velmi výrazně. Levá laterálně-dorzální habenula obsahuje více neuronů a je tedy mnohem větší, zároveň na rozdíl od pravé dostává signály z unilaterálního parapineálního orgánu, který je u 90 % danií uložen na levé straně. Naopak na pravé straně je větší mediálně-dorzální habenula a dominantně přijímá signály z čichového laloku (Güntürkün et al. 2020). Kromě toho pouze levá dorzální habenula přijímá zrakové signály z podskupiny gangliových buněk sítnice přes eminentia thalami (Zhang et al. 2017). To tedy znamená, že pravá habenula přijímá hlavně čichové podněty a levá hlavně zrakové podněty. Asymetrie habenulárních jader také ovlivňuje jejich rozdílnou projekci do jader mezimozku – dorzální IPN získává dominantně signály z levé laterálně-dorzální habenuly, ventrální IPN z pravé mediálně-dorsální habenuly (Roussigné et

al. 2012). Ventrální a dorzální IPN mají rozdílné projekce do tegmentárních jader a raphe nucleus zadního mozku a vzhledem k tomu, že tyto dvě oblasti mají význam pro emoční chování dania, asymetrie habenulárních jader ho tak nepřímo ovlivňuje (Chou et al. 2016).



Obrázek 9: **Morfologická asymetrie v epithalamu dania pruhovaného**

Epithalamus je dorzální součástí mezimozku obratlovců a je tvořen bilaterálními habenulárními jádry a nepárovým pineálním komplexem. Epifyza (=pineální orgán, P) žádnou morfologickou asymetrii nevytváří. Parapineální orgán (PP) se u většiny danií nachází na levé straně a vystupuje pouze do levého habenuly. Laterální dorzální habenulární jádro (ldHb) je výrazně větší na levé straně, zatímco mediální dorzální habenulární jádro (mdHb) je větší na pravé straně. Levá habenula přijímá zrakový vstup z ementia thalami, zatímco pravá habenula přijímá čichové vstupy z čichového bulbu. Dorzální interpedunculární jádro (IPN) dostává vstup převážně z levého ldHb, zatímco do ventrálního IPN směřují převážně vlákna z pravého mdHb. Dorzální IPN dále vede signál do dorzální tegmentální oblasti (dTA), ventrální IPN do raphe nucleus (MR).

Převzato a upraveno podle: Güntürkün et al. (2020)

4. Vývoj levo-pravé asymetrie mozku u dania pruhovaného

Konkrétně do ustanovení asymetrie epithalamu dania jsou zapojeny čtyři hlavní dráhy: Nodal, FGF, Notch a Wnt/beta catenin (Hüsken et al. 2014).

4.1 FGF (fibroblast growth factor) dráha

Nodální dráha je sice zásadní pro regulaci ustanovení levo-pravé asymetrie epithalamu, první kroky jsou ale zprostředkované FGF signální drahou. FGF tvoří rodinu růstových faktorů, mezi které u člověka patří 22 členů, u dania 10 členů. Sdílejí mezi sebou až 50 % homologii aminokyselinové sekvence. Tyto polypeptidy mají dva konzervované cysteinové zbytky a vyznačují se vysokou afinitou k heparinu (Kelly et al. 2020). Jedná se o významně multifunkční molekuly s širokým polem působnosti, které mají řadu účinků během embryonálního vývoje a homeostázy. Většina FGF působí prostřednictvím svých specifických receptorů (FGFR) – po jejich aktivaci jsou signály přenášeny prostřednictvím tří dominantních drah - RAS/MAPK, PI3k/AKT a PLC γ (Yun et al. 2010).

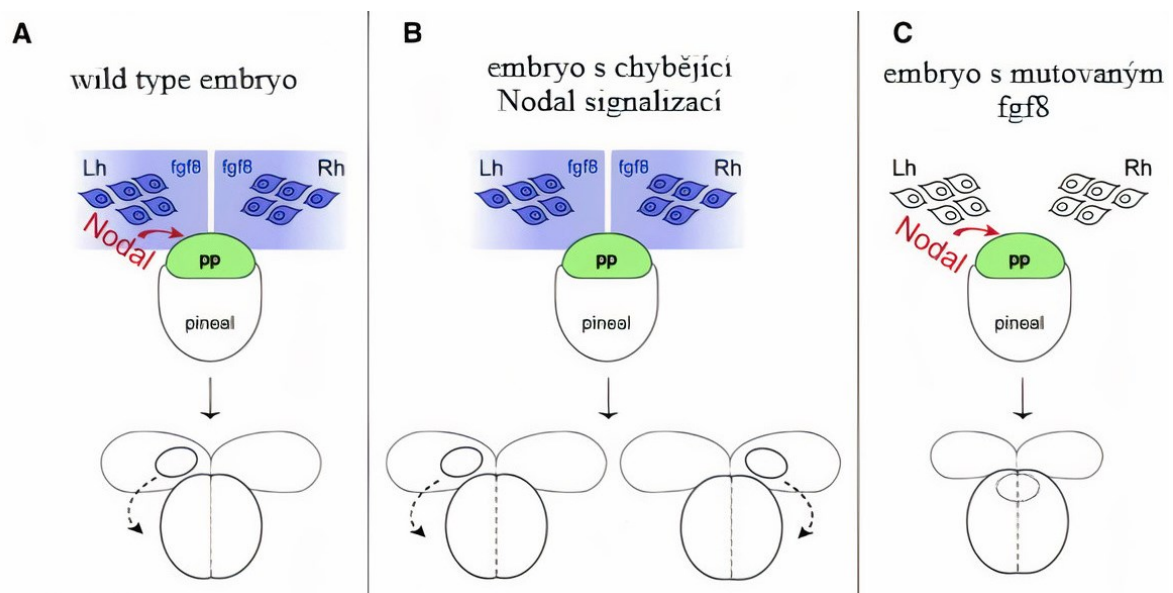
Počáteční migrace parapineálního orgánu ze střední linie do laterální polohy v mozku je řízena konkrétně fibroblastovým růstovým faktorem Fgf8. Pokud signalizace prostřednictvím Fgf8 chybí, nevyvíjí se epithalamická asymetrie (Güntürkün a Ocklenburg 2017). FGF signalizace také hraje roli v asymetrii habenu. Zdá se tedy, že narušuje symetrii, ale pro její směr je potom zásadní právě nodální dráha (Palma et al. 2022).

4.2 Nodální dráha

Rodina proteinů Nodal tvoří podskupinu superrodiny transformujícího růstového faktoru beta (TGF β), je zodpovědná např. za indukci entomezodermu nebo patternování nervového systému. Aktivace dráhy Nodal zahrnuje vazbu Nodalu na aktivinové receptory a koreceptory, což vede k fosforylaci Smad2, čímž je signalizace intracelulárně přenášena. Komplex P-Smad2/Smad4 se následně přemístí do jádra, kde interaguje s transkripčními faktory, jako jsou FoxH1, a Mixer (Schier 2003).

Aktivní nodální dráha (viz. výše) se u wild-type larev dania vyskytuje téměř výhradně v levém epithalamu a je sama o sobě závislá na levostranných nodálních signálech z mezodermu laterální ploténky. U danií bez signalizace prostřednictvím proteinu Nodal migrují parapineální buňky směrem ke zdrojům FGF bez ohledu na to, kde jsou umístěny, to znamená směrově

náhodně (Duboc et al. 2015). Pokud je Nodal signalizace neporušená, parapineální buňky migrují převážně na levou stranu (Regan et al. 2009). Skupina ryb Teleostei, do které patří danio, má tři různé nodal geny (savci mají jeden, mezi ostatními skupinami je počet různý) – *Ndr1* (=nodal related 1)/*squint*, *Ndr2/cyclops* a *Ndr3/southpaw* (Long et al. 2003). V rámci nodální signální kaskády je levá asymetrie parapineálního komplexu iniciována genem *cyclops*, který je nezbytný pro expresi inhibitoru zpětné vazby *Lefty1* (u dania se nachází dva geny *lefty* – *lefty1* a *lefty2*) a transkripčního faktoru *Pitx2* (Duboc et al. 2015). Diencefalické levo-pravé asymetrie také vyžadují aktivitu genu *southpaw*, který je bilaterálně přítomen v prekurzorech paraxiálního mezodermu a poté v mezodermu levé laterální ploténky. *Southpaw* řídí asymetrii srdce, slinivky břišní a mozku. Embrya s deficitem *southpaw* vykazují závažnou downregulaci levostranné exprese *cyclops*, *pitx2*, *lefty1* a *lefty2* (Long et al. 2003).



Obrázek 10: **Role FGF a Nodal signalizace při vývoji epithalamu dania pruhoaného**

(A) Wild type embryo: symetrické signály *fgf8* z habenul (modrá) indukují migraci parapineálního primordia (zelená), Nodální signály (červená) pak řídí směr migrace doleva.

(B) Embryo s chybějící Nodal signalizací - symetrie je narušena díky *Fgf8*, které vyvolává migraci, Nodal signalizace chybí – chybí tedy i signál pro migraci doleva, směr strany migrace parapineálního primordia tedy probíhá stochasticky.

(C) Embryo s mutovaným *fgf8*: Parapineální primordium zůstává v mediální linii a není schopno migrovat ani jedním směrem.

pp – parapineální primordium; Lh - levá habenula; Rh - pravá habenula

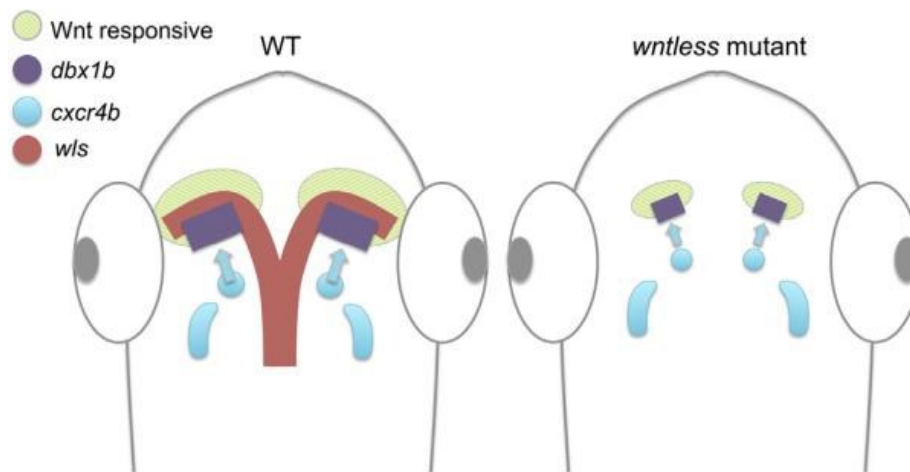
Převzato a upraveno podle: Regan et al. (2009)

4.2 Dráhy Notch a Wnt/beta catenin

Co se týče signalizačních drah Notch a Wnt/beta-catenin, obě se podílí na správné funkci organizátoru a struktury řasinek. Konkrétně Notch dráha např. řídí délku řasinek (Reiter et al. 2017), což by při porušení těchto drah mohlo způsobit narušení jednostranného toku v LRO a správného ustanovení Nodal dráhy, čímž by mohlo dojít k narušení ustanovení levo-pravé asymetrie. Obě dráhy jsou aktivní v mezodermu laterální ploténky ještě předtím, než se začnou exprimovat geny Nodální kaskády. Signalizace prostřednictvím Wnt reguluje ciliogenezi u dania prostřednictvím Foxj1a, ciliogenního transkripčního faktoru, a později přispívá ke správné levostranné expresi *nodal* genu potlačením jeho represe (De Girolamo et al. 2020).

Konkrétně v mozku a při vývoji epithalamu dráha Wnt zprostředkovává několik klíčových procesů. Patří mezi ně specifikace ventrální habenuly, kontrola časových aspektů tvorby neuronů a stanovení identit těchto neuronů v dorzální habenule během diferenciaci. Represe aktivity Wnt na levé straně mozku, kdy interaguje s parapineálním komplexem v konkrétním časovém období, má za následek asymetrie v habenuлах a podporuje formování neuronálních identit na pravé straně dorzální oblasti mozku (viz Obrázek 11) (Lanoizelet et al. 2023).

Dráha Notch je také klíčovým hráčem při vývoji asymetrie mozku, zejména v oblasti dorzální habenuly (dHb) - ovlivňuje regulaci proliferace a diferenciaci buněk v této oblasti. Je velmi pravděpodobné, že dráhy Notch a Wnt spolupracují či se navzájem ovlivňují během vývoje, což může hrát klíčovou roli při určování specifických charakteristik a funkcí dorzální habenuly (Hüsken a Carl 2013).



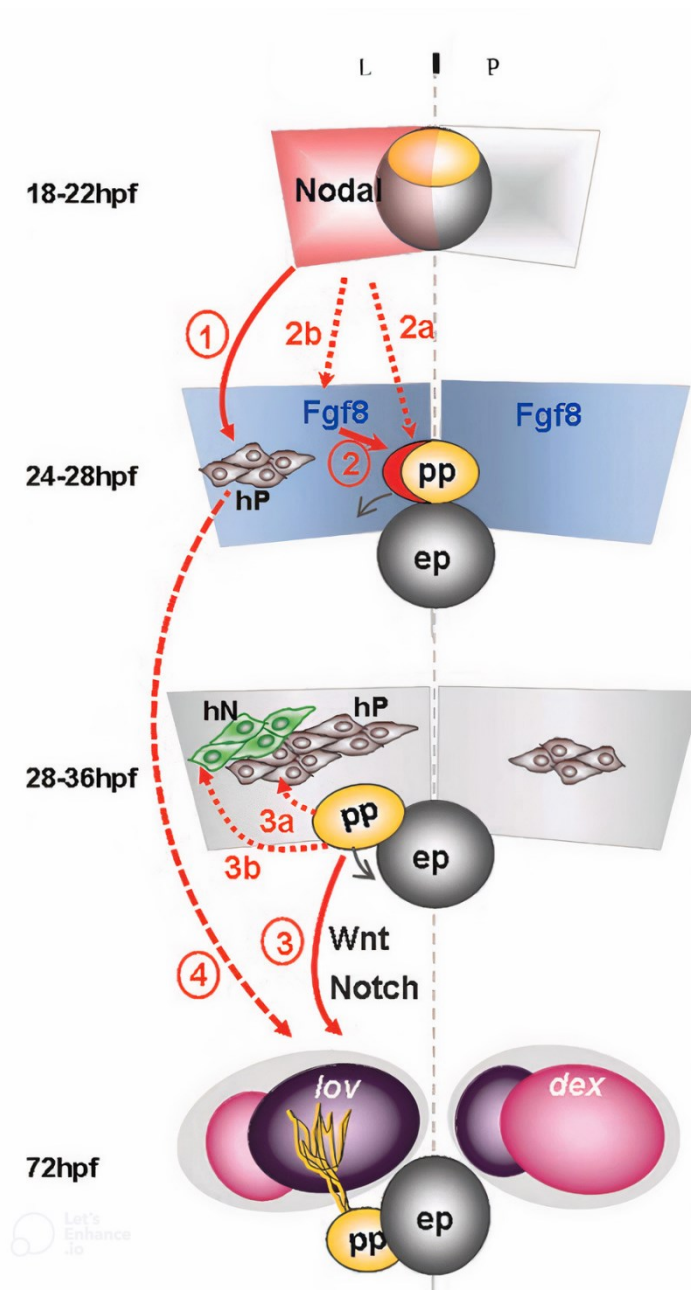
Obrázek 11: *Role Wnt signalizace při vývoji dorzálních habenuł u dania pruhovaného*
Navržený model o působení Wnt signalizace při vývoji dorzálních habenuł. Předpokládá se, že Wnt signalizace ovlivňuje tvorbu dorzálních habenuł (ty exprimují *dbx1b* – fialová) a následný recruitment progenitorů (exprimujících *cxcr4b* – světle modrá). Je navrženo, že snížená Wnt signalizace u homozygotních *wls* mutantů by způsobovala redukcii *dbx1b* exprese v habenułách a migraci buněčné populace exprimující *cxcr4b* do dorzálních habenuł.

Přejato z: Kuan et al. (2015)

4.3 Průběh ustanovení asymetrie – propojení drah dohromady

Nejranější levo-pravě asymetrickou expresí v mozku dania v místě budoucího epithalamu je exprese genu *Ndr2/cyclops* (18 hpf = hours post fertilization), přičemž ustanovení levo-pravé asymetrie epithalamu pomocí nodal-related proteinů bylo zatím prokázáno pouze u ryb (Concha 2001). Ten se začíná exprimovat zhruba 8 hodin před tím, než začne migrovat parapineální orgán na levou stranu. Po něm se začíná exprimovat *lefty1* (20 hpf) a *pitx2c* (22 hpf). Exprese těchto genů koreluje s expresí *flh*, který je markerem budoucího pineálního komplexu, zároveň ale vybíhá i do míst budoucí levé habenuly – znamená to, že aktivita Nodal signální dráhy ovlivňuje vývoj jak pineálního komplexu (možná i parapineálního orgánu), tak levé habenuly (Roussigné et al. 2012). Při absenci nodální signalizace je epithalamus sice asymetrický, ale zcela na náhodnou stranu (viz Obrázek 10). Nodál signalizace tedy neurčuje ustanovení asymetrie jako takové (za to je zodpovědný Fgf8), ale určuje její směr (Palma et al. 2022).

K determinaci parapineálního orgánu, ke které dochází zhruba 28 hodin po oplození (viz Obrázek 12), je zapotřebí transkripčního faktoru Tbx2 a Fgf8. Parapineální orgán se delaminuje z oblasti přední části pineálního komplexu a poté migruje doleva, což zajišťuje také Fgf8 (Regan et al. 2009; Snelson a Gamse 2009). Mutanti v Fgf8 mají sice specializované buňky parapineálního orgánu, ty ale nejsou schopné vycestovat (jak jsem zmínila výše, Fgf8 určuje pouze schopnost mobility, za směr je zodpovědný *ndr2/cyclops*). Dorzální habenulární progenitory jsou přítomné dříve na levé straně, což má za následek vyšší počet neuronů v levém dorzálním habenulárním jádře než v pravém u dospělého. Je pravděpodobné, že za touto heterochronicitou vývoje jednotlivých habenule stojí Notch dráha (Aizawa et al. 2007). Wnt dráha zase reguluje diferenciaci pravé a levé dorsální habenuly (IdHb a mdHb), respektive osud jednotlivých neuronů. Při zvýšené Wnt signalizaci dochází ke zdvojenému pravému habenulárnímu fenotypu (Carl et al. 2007). Naopak mutace v genu *Tcf7l2*, který kóduje transkripční faktor zprostředkovávající Wnt signalizaci a který je nezbytný pro získání “pravostranné“ identity, způsobují, že většina pravých habenulárních neuronů získá identitu levé habenuly nezávisle na parapineálním orgánu. Na levé straně Wnt signalizaci pravděpodobně blokuje parapineální orgán. Mechanismus této modulace zatím není znám, ale zdá se, že může souviset s počtem buněk parapineálního orgánu – potlačením aktivity *Pitx2c* se stane, že pravá habenula přijme levostranný charakter a zároveň vzroste počet buněk parapineálního orgánu. Pokud ale tento počet buněk uměle snížíme na úroveň jedince s plně funkčním genem pro *Pitx2*, parapineální orgán je schopen obnovit habenulární asymetrii (Garric et al. 2014).



Obrázek 12: **Interakce signálních drah při ustanovení asymetrie v epithalamu dania pruhovaného** FGF dráha vytváří asymetrii tím, že způsobuje migraci paraxiálního orgánu - konkrétně pomocí Fgf8 (2). Dráha Nodal signalizace dodává této migraci levostrannou orientaci a moduluje aktivitu Fgf8 (2b) a působí na paraxiální buňky, aby měly vyšší kompetenci migrovat (2a). Zároveň ovlivňuje asymetrii v souboru časných habenulárních neuronů (1), což později ovlivňuje habenulární asymetrii (4). Paraxiální orgán je nutný pro pozdější vývoj habenul (3) – mohl by ovlivňovat tvorbu různých typů habenulárních neuronů (3a) nebo přímou specifikaci těchto neuronů (3b). Tyhle dvě role by mohly být modulovány pomocí Wnt a Notch signalizace.

hP- habenulární progenitory, hN – habenulární neurony, pp – paraxiální orgán, ep – epifyza.

Převzato a upraveno podle: Roussigné et al. (2012)

5. Asymetrie mozku v evolučním kontextu

5.1 Evoluční výhody lateralizace

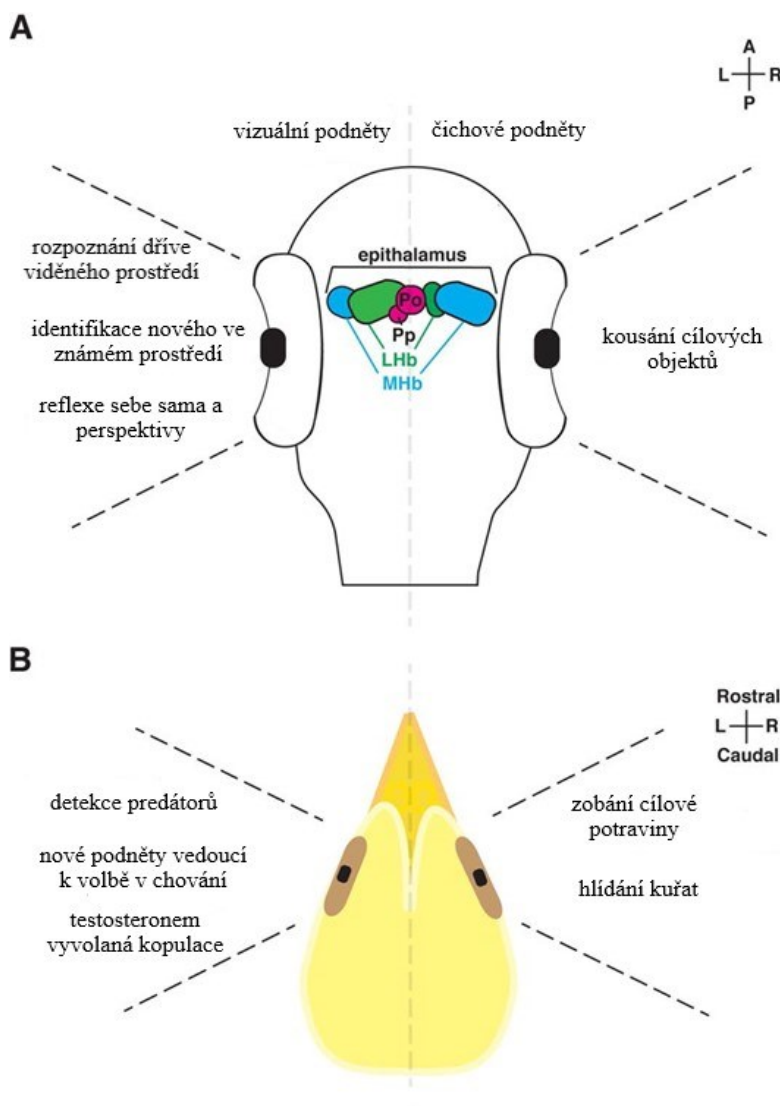
Asymetrie mozku nemusí být pouze morfologická, ale ještě častěji se vyskytuje jako funkční asymetrie – lateralizace. Lateralizace je tedy tendence k preferování jedné strany těla, konkrétně u mozku levá a pravá strana zpracovávají informace odlišně a řídí různé vzorce chování. Je široce rozšířená mezi mnoha druhy žijícími v různých ekosystémech, takže je velmi pravděpodobné, že musí mít významný přínos pro přizpůsobení a úspěšnost organismů, když se tak úspěšně evolučně zafixovala.

Existují různé mechanismy, které spojují asymetrii mozku či chování s výkonem jedince na individuální úrovni. Za prvé, pokud zvíře používá dominantně jednu končetinu nebo stranu sensorických systémů k interakci s prostředím, hemisféra na opačné straně bude procházet celoživotním učením v oblasti vnímání nebo motoriky. Tím se jednostranně zvýší schopnost smyslové senzitivity a účinnosti pohybu. Například pisila čáponohá (*Himantopus himantopus*) při lovu používá především pravé oko, a díky tomu je její lov efektivnější a úspěšnější (Ventolini et al. 2005). Stejně tak kobylky při dlouhých skocích preferují jednu nohu a jedinci s výraznou preferencí jedné nohy jsou úspěšnější (Bell a Niven 2016). Takže i malá výhoda jedné strany v kombinaci s lateralizovaným cvičením zvyšuje výkon a reakční rychlost, a tím posiluje pravděpodobnost opakovaného používání této strany. Zároveň zvýšený trénink jedné strany zvyšuje reakční rychlost (Güntürkün et al. 2020).

Dále také pokud jsou dva komplementární nervové procesy zpracovávány paralelně ve dvou hemisférách, snižuje se kognitivní redundance a celková účinnost se zvyšuje – je umožněno současné zpracování více zdrojů informací (Rogers 2021, Ringo et al. 1994). Lateralizace mozkových funkcí je tedy schopna zvýšit kognitivní kapacitu bez nákladnějšího procesu zvětšování velikosti mozku. Když jsou jedinci s lateralizací (experiment byl prováděn na kuru domácím *Gallus gallus*) a jedinci bez ní postaveni před úkol, při kterém musí rychle hledat rozsypaná zrna mezi oblázky a současně sledovat dravce, kteří občas proletí nad nimi, jedinci s preferencí strany zvládají obě úlohy na vyšší úrovni. Jedinci bez lateralizace si vedou hůře, protože někdy nezpozorují predátora a když ho zahlédnou, často si pletou zrna s oblázky. To naznačuje, že hemisférická asymetrie umožňuje efektivní paralelní zpracování komplementární informace mezi oběma hemisférami (Rogers et al. 2004). Podobné výsledky byly nalezeny také u ryb a u různých druhů primátů (Dadda a Bisazza 2006).

Zároveň je třeba dodat, že lateralizace může být pro jedince i negativní, pokud je velmi výrazná – v tom případě snižuje flexibilitu jedince reagovat. Existuje jistý optimální kompromis mezi symetrií a asymetrií funkce, ale kde leží bod rovnováhy, závisí na konkrétním případě (Rogers 2021).

Lateralizace na úrovni populace je komplexnější problém – zvláště u živočichů, která žijí ve skupinách. Při napadení skupiny predátorem většina skupiny využije efektu zředění, kdy, když se celá skupina otočí jedním směrem, je menší pravděpodobnost, že právě jeden konkrétní jedinec bude uloven. Zároveň ale ve chvíli, kdy se predátor naučí preference strany útěku své kořisti, je výhodné pro jedince se otáčet na druhou stranu. Tato menšina pak může mít lepší pravděpodobnost na přežití (Bisazza et al. 2000; Vallortigara a Rogers 2005). Tímto způsobem vzniká rozdělení populace na většinu jedinců preferující jednu stranu a menšinu preferující stranu opačnou, protože existuje adaptivní výhoda v zachování variací v lateralitě u menšiny jedinců (Güntürkün et al. 2020).



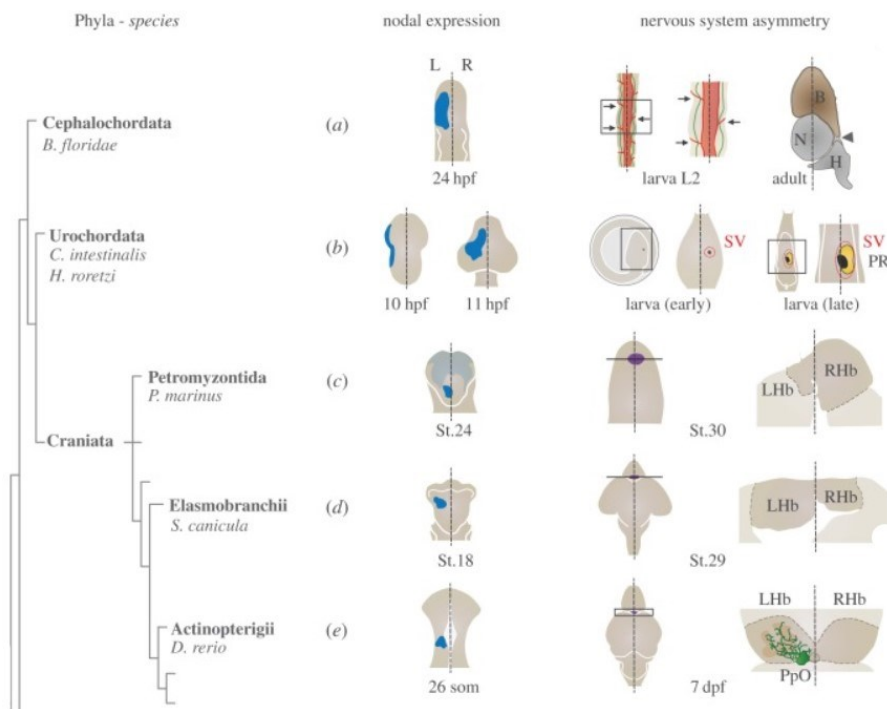
Obrázek 13: *Lateralizace nervové soustavy u dania a kuřete*

(A) *Asymetrie epithalamu a vizuální lateralizace dania pruhovaného*
(B) *Vizuální lateralizace kuřete*

Převzato a opraveno podle: Alqadah et al. (2018)

5.2 Ustanovení levo-pravé asymetrie mozku v evoluci

Asymetrické uspořádání mozku jak na morfologické, tak na funkční úrovni je tedy z různých důvodů (viz výše) výhodným rysem. Je proto široce rozšířené v živočišné říši (Concha et al. 2016) a vypadá to, že jde o původní znak pro obratlovce, protože jak u kopinatců, tak u sumek – tedy u zástupců dvou sesterských skupin obratlovců (pláštěnců a bezlebečných) se asymetrie nervové tkáně vyskytují také (viz. Obrázek 14). U kopinatců jsou identifikovány asymetrické polohy úst a struktur faryngeální oblasti, což je doprovázeno asymetrickým uspořádáním bilaterálně párových somatických neuronů a periferních nervů spojených se somity (Soukup et al. 2015). Tato asymetrie je předcházena a regulována levostrannou aktivitou signální dráhy Nodal. Sumky zase vykazují (zase řízeno signální drahou Nodal) asymetrie v umístění sensorického váčku a poloze fotoreceptorových buněk na pravé straně (Taniguchi a Nishida 2004).



Obrázek 14: **Distribuce asymetrické Nodal signalizace spojené s asymetriemi nervové soustavy ve fylogenezi strunatců**

- Nodal exprese na levé straně hlavy bezlebečných (Cephalochordata) – konkrétně *Branchiostoma floridae* – řídí vývoj a asymetrii somatických neuronech a periferních nervech.
- Nodal exprese v levé epidermis pláštěnců (Urochordata) – konkrétně *Ciona intestinalis* a *Halocynthia roretzi* – řídí pravostranné umístění sensorického váčku a fotoreceptorových buněk (PR).
- Nodal exprese v epithalamu mihule (Petromyzontida) - konkrétně *Petromyzon marinus* - řídí vývoj asymetricky velkých habenul (LHb a RHb).
- Nodal exprese v epithalamu u žraloka (Elasmobranchii) - konkrétně *Scyliorhinus canicula* - řídí vývoj asymetricky velkých habenul.
- Nodal exprese v epithalamu paprskoploutvých ryb (Actinopterygii)- konkrétně *Danio rerio* – řídí vývoj asymetricky velkých habenul a asymetricky uloženého parapineálního orgánu (PpO).

Pro každou skupinu je asymetrická Nodal exprese zobrazena na obrázku vlevo, morfologická asymetrie nervového systému je na obrázku vpravo

hpf – hodiny po oplodnění, N – notochord, H – Hatschekova jamka, B – mozek

Převzato a upraveno podle: Concha et al. (2016)

Co se konkrétně morfologických asymetrií epithalamu týče, jedná se mezi obratlovci o široce rozšířený a výrazně variabilní znak. Tyto asymetrie zahrnují rozdíly ve velikosti, neuronální organizaci, neurochemii a konektivitě mezi levými a pravými částmi epithalamu. Pokud se v epithalamu vyskutekuje fotoreceptivní parapineální orgán (tak jako u ryb skupiny Teleostei, kam patří danio), vyskutekuje se nejčastěji na levé straně (Concha a Wilson 2001). Evoluční původ epithalamických struktur je nejistý, ale asymetrie v této oblasti pravděpodobně existovala na bázi linie obratlovců, možná dokonce strunatců (Concha a Wilson 2001). Naznačuje to i fakt, že Nodal signalizace ovlivňující asymetrii epithalamu byla nalezena i u žraloků a mihulí, ačkoliv její role se od dania liší (Lagadec et al. 2015). Pokud signál Nodal signalizace chybí, tak dojde u dania k náhodnému rozložení levo-pravé asymetrie epithalamu (tj. nedochází k izomeriím). U žraloka a mihule však následkem absence Nodal dráhy dojde k izomerii habenulárních jader (Lagadec et al. 2015). To ukazuje, že u dania Nodal řídí pouze směr asymetrie (tj. laterality, viz výše), u žraloka a mihule ale indukuje asymetrii jako takovou. Z toho lze vyvodit (viz Obrázek 15), že je pravděpodobné, že evolučně původnější je funkce Nodal signální dráhy jako regulátoru samotné asymetrie epithalamu. Role Nodal dráhy pro regulaci morfologické laterality epithalamu, která se nachází u dania, je tak zřejmě odvozená (Lagadec et al. 2015; Duboc et al. 2015). Naznačuje to i fakt, že epithalamus (konkrétně habenuly) u žraloka vykazují starověké asymetrie čelistnatých obratlovců, ztracené u dania (Lanoizelet et al. 2023).

Dlouho se zdálo, že u tetrapodů důležitost Nodal signální dráhy v mozkových asymetriích mizí, vzhledem k tomu, že levo-pravá asymetrie epithalamu drápatky, kuřete ani myši není Nodal signální dráhou řízena. Recentní práce však ukazují, že k předpokládané ztrátě Nodal signalizace regulující levo-pravou asymetrii epithalamu u předka všech tetrapodů nedošlo. U čolka byla prokázána asymetrická exprese *Nodal1* v mozku (Ito et al. 2006) a u dvou druhů želv byla role Nodal signální dráhy v regulaci levo-pravé asymetrie epithalamu potvrzena také (Kajikawa et al. 2022). U gekona naopak prokázána nebyla (Kajikawa et al. 2022). Tyto výsledky naznačují, že levo-pravá asymetrie epithalamu je u různých obratlovců řízena různě a že v evoluci obratlovců zřejmě došlo k nezávislým ztrátám role Nodal dráhy v regulaci levo-pravé asymetrie epithalamu. Jakým způsobem je morfologická levo-pravá asymetrie epithalamu řízena u druhů, kde Nodal dráha nepůsobí (žáby, někteří plazi, ptáci, savci), však není známo.

6. Další faktory ovlivňující levo-pravou asymetrii mozku

6.1 Environmentální faktory

Kromě genetických faktorů, které jsou zmíněny výše, je vývoj mozkových asymetrií často závislý na podmínkách životního prostředí. Vliv světla, který je nejprozkoumanějším a nejznatelnějším příkladem vlivu environmentálních faktorů na vznik mozkových asymetrií během vývoje, byl navržen i u dania. Bylo skutečně prokázáno (Andrew et al. 2009), že preference očí při vyhýbání se predátorovi či jiných vizuálních úkolech závisí na vystavení embryí světlu, ale mechanismus toho, jakým způsobem přesně expozice světlu vytvoření asymetrií ovlivňuje, není jasný. Nejvíce prozkoumaní jsou v tomto ohledu ptáci, kteří vykazují jak behaviorální, tak i strukturální mozkové asymetrie. Modelovým organismem je holub (*Columba livia*) a kur domácí (*Gallus gallus*). Oba tyto druhy vykazují behaviorální asymetrie při různých vizuálních úkolech, sociálním chování či prostorové orientaci. Nejedná se však o levo-pravé asymetrie smyslových orgánů, ale asymetrie lze nalézt hlouběji v mozku – v mezencefalonu (u holuba) a diencefalonu (u holuba i u kura). Konkrétně se jedná o asymetrie v síle projekce nebo ve velikosti buněk mezi levou a pravou stranou (Güntürkün et al. 2020). U holubů i kuřat jsou tyto behaviorální i anatomické asymetrie, hlavně logicky ty vizuální, také indukovány světlem. Během svého vývoje ve vajíčku ptačí embryo zaujímá asymetrickou polohu vůči světlu – pravé oko je na straně skořápky, kterou prosvítá světlo, zatímco levé je stíněno zbytkem těla embrya. Pravé oko je tedy světlem silněji stimulováno a tím je způsoben vznik následných asymetrií. Tento fenomén byl ověřen experimenty s vejci inkubovanými ve tmě – v takovém případě tyto asymetrie nevznikaly. Experimenty s manipulovanou osvětlenou stranou (osvětleno bylo tedy levé oko) měly za výsledek asymetrii opačnou. Ptáci vylíhnoucí z vajec, ve kterých bylo osvětlené pravé oko, používají přednostně právě pravé oko a tím pádem levou hemisféru k řešení vizuálních úkolů. Ptáci manipulovaní tak, aby bylo zakryto pravé oko, vykazovali ve stejném testu opačnou asymetrii a ptáci inkubovaní ve tmě nevykazují žádnou asymetrii v používání levé nebo pravé hemisféry (Chiandetti 2011; Chiandetti a Vallortigara 2009; Rugani et al. 2015).

Dalším příkladem prokázaného faktoru prostředí je znečištění – konkrétně zvýšené hodnoty CO₂ v atmosféře, který se rozpouštěním ve vodě druhotně projevuje okyselením oceánů. Ukazuje se, že u některých druhů ryb nadmíra CO₂ způsobuje ztrátu lateralizace a tím jim vytváří nevýhodu ve svých přirozených habitatech větší náchylností vůči predátorům či v sociálním chování (Lopes et al. 2016; De Girolamo et al. 2020).

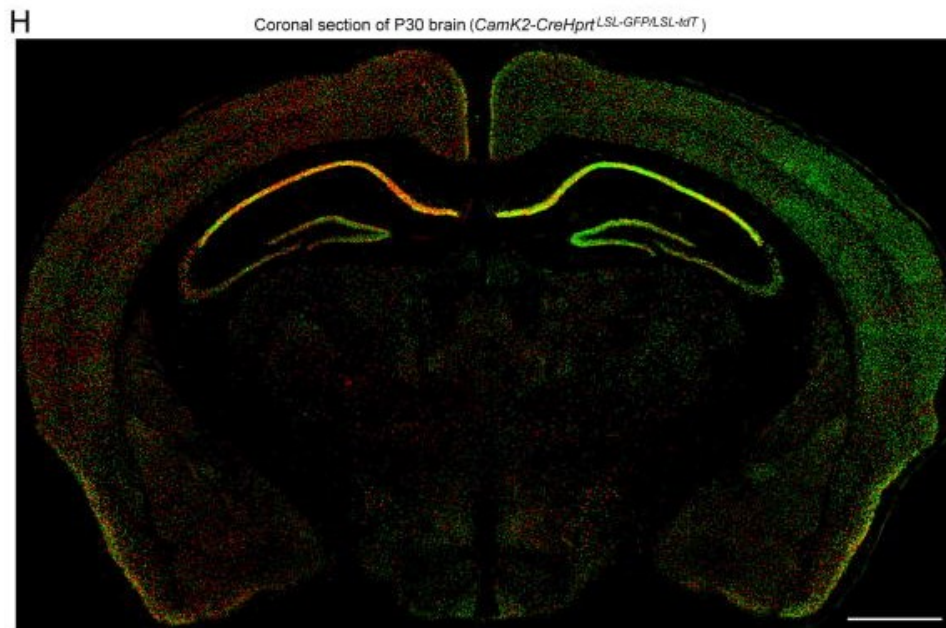
6.2 Epigenetické faktory

Studii zabývající se vlivem epigenetických faktorů na ustanovení mozkových asymetrií je zatím velmi málo, ale ty existující naznačují, že by epigenetické faktory mohly být funkčně významné. Epigenetické mechanismy mění expresi genů beze změny nukleotidové sekvence a tím mohou způsobovat fenotypové změny. Nejčastější a nejlépe porozuměnou epigenetickou modifikací je methylace – připojování methylové skupiny na cytosin-guaninové dinukleotidy (CpG). Více methylované úseky DNA jsou typicky umlčovány – transkripce tohoto genu je potlačována. Klíčové je, že tyto epigenetické značky se mohou částečně dědit od rodičů, mohou být ale také získávány faktory prostředí (Tammen et al. 2013).

Co se týče studií zabývající se lidským druhem, byly studovány hlavně methylace genů NEUROD6 (Schmitz et al. 2018) a LRRTM1 (Leach et al. 2014). Ty ukázaly vztah mezi asymetrií v dominanci používání pravé či levé ruky a silou methylace těchto genů. U genu NEUROD6 bylo předběžně prokázáno, že porodní stres může být faktorem, který ovlivňuje metylaci tohoto genu, jež je asymetricky exprimován v mozku plodu. Methylace v promotoru genu LRRTM1 odhalila CpG úseky, které negativně korelovaly se silou preference používání levé a pravé ruky účastníků studie, což znamená, že účastníci se silnější metylací těchto oblastí měli větší sklony k obourukosti.

Epigenetické faktory se také významně uplatňují při transkripční inaktivaci jednoho z chromozomů X u samic s určením pohlavím typu *Drosophila*, kde samice (homogametické pohlaví) mají dvě kopie stejného pohlavního chromozomu, z nichž jeden je inaktivován. Inaktivace jednoho z chromozomů X (založená na vysoké míře methylace DNA, nízké acetylaci histonů, nízké míře specifické methylace lysinu-4 a vysoké míře methylace lysinů-9 a 27 histonu H3) je obecně považována za náhodnou. Studie (Wu et al. 2014) využívající jaderně lokalizované fluorescenční reportéry – GFP na jednom chromozómu X a tdTomato na druhém (pomocí těchto fluorescenčních reportérů je možné studovat vzor inaktivace chromozomu X pocházejícího od otce nebo matky s rozlišením na úrovni buněk) však v určitém procentu jedinců ukázala velice překvapivě asymetrický vzor inaktivace chromozomu X (viz Obrázek 15) – a to u excitačních neuronů kortexu a hipokampu dospělé myši. Vzhledem k tomu, že u samců se podobný typ inaktivace nevyskytuje, mohl by tento výsledek ukazovat na odlišnou pravolevou asymetrii mezi samčím a samičím mozkem savců (určení pohlaví *Drosophila*) s příspěvkem genových variant lokalizovaných na chromozomu X (jedná se o přibližně 4 % genomu). Dále tato data implikují možnou roli inaktivace chromozomu X při

vytváření individuálních stochasticky generovaných funkcionalit centrálního nervového systému, existujících pouze u samičího pohlaví.



Obrázek 15: *Levo-pravá asymetrie inaktivace X chromozomu v mozku myši*
Vzor inaktivace jednoho či druhého X chromozomu v mozku dospělé myši u excitačních neuronů kortexu a hipokampu. Využívají se zde jaderně lokalizované fluorescenční reportéry – GFP na jednom chromozómu X a tdTomato na druhém.

Meřítko 1 mm.

Převzato z: Wu et al. (2014)

Na důležitost epigenetických vzorů rozdílně manifestovaných v levo-pravě asymetrickém mozku ukazuje také práce (Li et al. 2020) korelující epigenetiku s velice zajímavým asymetrickým poškozením mozku u pacientů trpících Parkinsonovou chorobou. Pomocí bisulfátového sekvenování bylo ukázáno, že neurony lidského předního mozku vykazují hemisférické rozdíly v metylaci DNA ovlivňující transkripci tisíců genů. Zajímavým zjištěním je to, že s věkem dochází k ztrátě hemisférické asymetrie v epigenomech neuronů. U neuronů pacientů s Parkinsonovou chorobou (PD) je hemisférická asymetrie v metylaci DNA větší než u kontrol a zahrnuje mnoho genů spojených s rizikem vzniku PD. Epigenetické, transkriptomické a proteomické rozdíly mezi hemisférami PD odpovídají lateralizaci symptomů PD, přičemž epigenetické abnormality jsou nejvýraznější v hemisféře odpovídající straně převládajících symptomů.

Obecně je téma levo-pravé asymetrie příznaků neurodegenerativních chorob, kromě již zmíněné PD i se jedná např. o Alzheimerovu chorobu, amyotrofickou laterální sklerózu nebo roztroušenou sklerózu, (v některých případech s epigenetickým příspěvkem) významným tématem neurologického výzkumu (Lubben et al. 2021).

Závěr

Tato bakalářská práce se zaměřuje na průběh ustanovení levo-pravé asymetrie mozku a regulaci tohoto děje u modelového organismu dania pruhovaného (*Danio rerio*). Předpokládá se, že u některých organismů dochází k narušení asymetrie již ve stadiu blastomer, základem narušení symetrie embrya je však jednostranný tok tekutiny v LRO, který je tvořený jednostranně pohyblivými řasinkami. Není ještě plně objasněno, jak je tento tok interpretován, ale jako nejpravděpodobnější se jeví mechanosenzorický model popisující dva typy řasinek – pohyblivé, vytvářející tento jednostranný tok, a nepohyblivé, které tento tok vnímají a interpretují. Interpretace tohoto jednostranného toku způsobuje asymetrii v genové expresi a aktivuje Nodal signalizační kaskádu. Ta je založená na tom, že Nodal je zpočátku exprimován bilaterálně kolem LRO. Tato asymetrie exprese je však narušena působením jednostranného toku, poté se exprimuje pouze na levé straně. Aktivita Nodalu se přenáší do LPM - Nodal zde indukuje svou vlastní expresi a také spouští expresi faktoru Lefty a transkripčního faktoru Pitx2. Lefty difunduje rychleji než Nodal a zároveň má schopnost ho inhibovat – zajišťuje tedy, že se Nodal omezí na levou stranu. Tam Nodal dále zvyšuje svou vlastní expresi a expresi Lefty a Pitx2. Pitx2 následně spouští genovou expresi a podporuje tkáňově specifickou proliferaci a diferenciaci, což vede k asymetrickému vývoji orgánů.

O tom, jak přesně je signál z těla přenášen do mozku se stále příliš neví, jasné ale je, že i v mozku je při ustavování asymetrie klíčový Nodal a jím řízená signalizační kaskáda obsahující Lefty a Pitx2. Morfologickou asymetrii mozku tato práce demonstruje na příkladu epithalamu u dania pruhovaného. Jak habenuly, tak parapienální orgán jsou výrazně morfologicky asymetrické mezi pravou a levou částí mozku, což činí epithalamus ideálním modelovým příkladem. Tato asymetrie je ustanovená díky spolupráci drah Nodal, Fgf, Wnt a Notch.

Vzhledem k tomu, že je funkční i morfologická asymetrie mozku tak rozšířená věnuje se práce dále jejím evolučním výhodám, k nimž patří efektivnější využívání mozkové kapacity, větší schopnost paralelních drah, zpracovávajících informace a výhody v rámci populace. Dráha Nodal, klíčový hráč v ustanovení mozkové asymetrie u dania, je konzervovanou dráhou řídící levo-pravou asymetrii mozku obratlovců. Věnovala jsem se tedy i její roli u jiných druhů obratlovců v rámci asymetrických dějů v mozku.

Ačkoliv hlavním mechanismem ustanovení asymetrie jsou výše zmíněné signalizační kaskády, klíčovou roli mohou hrát také environmentální (mezi nejvýznamnější patří například světlo či množství CO₂) či epigenetické faktory, které jsou schopné tuto asymetrii významně ovlivňovat.

Seznam zkratek

CaM	Kalmodulin
Cer12	Cerberus-like 2
Fgf	Fibroblast growth factor
FoxH1	Forkhead box H1
Foxj1a	Forkhead box J1a
Gdf1	Growth and differentiation factor 1
GFP	Green fluorescent protein
GRP	Gastrocoel roof plate
hpf	Hours post fertilization
IPN	Interpendunkulární jádro
KV	Kupfferův váček
Lefty	Left-right determination factor
ldHb	Laterálně-dorzální habenula
LPM	Lateral plate mesoderm
LRRTM1	leucine-rich repeat transmembrane protein 1
LRO	Left-right organizer
mRNA	Messenger RNA
mdHb	Mediálně-dorzální habenula
Ndr	Nodal-related
NEUROD6	Neurogenic Differentiation 6
Nodal	Nodal growth differentiation factor
NVP	Nodal vesicular parcels
PD	Parkinson 's disease
Pitx2	Paired-like homeodomain transcription factor 2
PI3k/AKT	Phosphatidylinositol 3-kináza/proteinkináza B dráha
Pkd	Polycystin

PLC γ	Fosfolipáza C gamma
RAS/MAPK	Ras/mitogen-activated protein kinases
TGF β	Transforming growth factor β
Tcf712	Transcription factor 7-like 2
vHb	Ventrální habenula
Wnt	Wingless/Int-1

Reference

- Aizawa, Hidenori, Midori Goto, Tomomi Sato, and Hitoshi Okamoto. 2007. "Temporally Regulated Asymmetric Neurogenesis Causes Left-Right Difference in the Zebrafish Habenular Structures." *Developmental Cell* 12(1):87–98. doi: 10.1016/j.devcel.2006.10.004.
- Alqadah, Amel, Yi Wen Hsieh, Zachery D. Morrissey, and Chiou Fen Chuang. 2018. "Asymmetric Development of the Nervous System." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 247(1):124. doi: 10.1002/DVDY.24595.
- Amack, Jeffrey D. 2014. "Salient Features of the Ciliated Organ of Asymmetry." *BioArchitecture* 4(1):6–15. doi: 10.4161/BIOA.28014.
- Andrew, R. J., D. Osorio, and S. Budaev. 2009. "Light during Embryonic Development Modulates Patterns of Lateralization Strongly and Similarly in Both Zebrafish and Chick." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 364(1519):983–89. doi: 10.1098/RSTB.2008.0241.
- Barth, K. Anukampa, Adam Miklosi, Jenny Watkins, Isaac H. Bianco, Stephen W. Wilson, and Richard J. Andrew. 2005. "Fsi Zebrafish Show Concordant Reversal of Laterality of Viscera, Neuroanatomy, and a Subset of Behavioral Responses." *Current Biology: CB* 15(9):844–50. doi: 10.1016/J.CUB.2005.03.047.
- Bell, Adrian T. A., and Jeremy E. Niven. 2016. "Strength of Forelimb Lateralization Predicts Motor Errors in an Insect." *Biology Letters* 12(9). doi: 10.1098/RSBL.2016.0547.
- Bianco, Isaac H., and Stephen W. Wilson. 2009. "The Habenular Nuclei: A Conserved Asymmetric Relay Station in the Vertebrate Brain." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1519):1005. doi: 10.1098/RSTB.2008.0213.
- Blum, Martin, Thomas Weber, Tina Beyer, and Philipp Vick. 2009. "Evolution of Leftward Flow." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20(4):464–71. doi: 10.1016/J.SEMCDB.2008.11.005.
- Carl, Matthias, Isaac H. Bianco, Baubak Bajoghli, Narges Aghaallaei, Thomas Czerny, and Stephen W. Wilson. 2007. "Wnt/Axin1/ β -Catenin Signaling Regulates Asymmetric Nodal Activation, Elaboration, and Concordance of CNS Asymmetries." *Neuron* 55(3):393. doi: 10.1016/J.NEURON.2007.07.007.
- Cartwright, Julyan H. E., Oreste Piro, and Idan Tuval. 2004. "Fluid-Dynamical Basis of the Embryonic Development of Left-Right Asymmetry in Vertebrates." *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 101(19):7234–39. doi: 10.1073/pnas.0402001101.

Cartwright, Julyan H. E., Oreste Piro, and Idan Tuval. 2019. “Opinion Piece Chemosensing versus Mechanosensing in Nodal and Kupffer’s Vesicle Cilia and in Other Left-Right Organizer Organs.” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 375(1792):20190566. doi: 10.1098/rstb.2019.0566.

Chiandetti, Cinzia. 2011. “Pseudoneglect and Embryonic Light Stimulation in the Avian Brain.” *Behavioral Neuroscience* 125(5):775–82. doi: 10.1037/A0024721.

Chiandetti, Cinzia, and Giorgio Vallortigara. 2009. “Effects of Embryonic Light Stimulation on the Ability to Discriminate Left from Right in the Domestic Chick.” *Behavioural Brain Research* 198(1):240–46. doi: 10.1016/J.BBR.2008.11.018.

Chou, Ming Yi, Ryunosuke Amo, Masae Kinoshita, Bor Wei Cherng, Hideaki Shimazaki, Masakazu Agetsuma, Toshiyuki Shiraki, Tazu Aoki, Mikako Takahoko, Masako Yamazaki, Shin ichi Higashijima, and Hitoshi Okamoto. 2016. “Social Conflict Resolution Regulated by Two Dorsal Habenular Subregions in Zebrafish.” *Science* 352(6281):87–90. doi: 10.1126/science.aac9508.

Concha, Miguel L., Iskra A. Signore, and Karina Palma. 2016 “Nodal Signalling and Asymmetry of the Nervous System.” 371(1710):20150401 doi: 10.1098/rstb.2015.0401.

Concha, Miguel L., and Stephen W. Wilson. 2001. “Asymmetry in the Epithalamus of Vertebrates.” *Journal of Anatomy* 199(1–2):63–84. doi: 10.1046/J.1469-7580.2001.19910063.X.

Dadda, Marco, and Angelo Bisazza. 2006. “Does Brain Asymmetry Allow Efficient Performance of Simultaneous Tasks?” *Animal Behaviour* 72(3):523–29. doi: 10.1016/J.ANBEHAV.2005.10.019.

Djenoune, Lydia, Mohammed Mahamdeh, Thai V. Truong, Christopher T. Nguyen, Scott E. Fraser, Martina Brueckner, Jonathon Howard, and Shialou Yuan. 2023. “Cilia Function as Calcium-Mediated Mechanosensors That Instruct Left-Right Asymmetry.” *Science* 379(6627):71–78. doi: 10.1126/science.abq7317

Duboc, Véronique, Pascale Dufourcq, Patrick Blader, and Myriam Roussigné. 2015. “Asymmetry of the Brain: Development and Implications.” *Annu Rev Genet* 49:647–72. doi: 10.1146/annurev-genet-112414-055322.

- Facchin, Lucilla, Harold A. Burgess, Mahmud Siddiqi, Michael Granato, and Marnie E. Halpern. 2008. "Determining the Function of Zebrafish Epithalamic Asymmetry." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1519):1021–32. doi: 10.1098/RSTB.2008.0234.
- Francescato, Ludmila, Sarah C. Rothschild, Alexandra L. Myers, and Robert M. Tombes. 2010. "The Activation of Membrane Targeted CaMK-II in the Zebrafish Kupffer's Vesicle Is Required for Left-Right Asymmetry." *Development* 137(16):2753–62. doi: 10.1242/DEV.049627.
- Gamse, Joshua T., Yu Chi Shen, Christine Thisse, Bernard Thisse, Pamela A. Raymond, Marnie E. Halpern, and Jennifer O. Liang. 2001. "Otx5 Regulates Genes That Show Circadian Expression in the Zebrafish Pineal Complex." *Nature Genetics* 30:1 30(1):117–21. doi: 10.1038/ng793.
- Gamse, Joshua T., Christine Thisse, Bernard Thisse, and Marnie E. Halpern. 2003. "The Parapineal Mediates Left-Right Asymmetry in the Zebrafish Diencephalon." *Development* 130(6):1059–68. doi: 10.1242/DEV.00270.
- Garric, Laurence, Brice Ronsin, Myriam Roussigné, Sabrina Booton, Joshua T. Gamse, Pascale Dufourcq, and Patrick Blader. 2014. "Pitx2c Ensures Habenular Asymmetry by Restricting Parapineal Cell Number." *Development (Cambridge)* 141(7):1572–79. doi: 10.1242/DEV.100305.
- Gazzaniga, Michael S. 2000. "Cerebral Specialization and Interhemispheric Communication Does the Corpus Callosum Enable the Human Condition?" *Brain* 123:1293–1326. doi: 10.1093/brain/123.7.1293.
- De Girolamo, Paolo, Nina Patzke, Sebastian Ocklenburg, Maria Elena Miletto, Petrazzini Mariaelena Milettopetrazzini, Andrea Messina, Maria Elena, Miletto Petrazzini, Valeria Anna Sovrano, and Giorgio Vallortigara. 2020. "Brain and Behavioral Asymmetry: A Lesson From Fish." *Front Neuroanat.* 14:11 doi: 10.3389/fnana.2020.00011.
- Gregorek, J. C., H. R. Seibel, and R. J. Reiter. 1977. "The Pineal Complex and Its Relationship to Other Epithalamic Structures." *Acta Anatomica* 99(4):425–34. doi: 10.1159/000144865.
- Güntürkün, Onur, and Sebastian Ocklenburg. 2017. "Ontogenesis of Lateralization." *Neuron* 94(2):249–63. doi: 10.1016/J.NEURON.2017.02.045.

- Güntürkün, Onur, Felix Ströckens, and Sebastian Ocklenburg. 2020. “Brain Lateralization: A Comparative Perspective.” *Physiological Reviews* 100(3):1019–63. doi: 0.1152/physrev.00006.2019.
- Hamada, Hiroshi. 2020. “Molecular and Cellular Basis of Left-Right Asymmetry in Vertebrates.” *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 96(7):273–96. doi: 10.2183/PJAB.96.021.
- Hamada, Hiroshi, Chikara Meno, Daisuke Watanabe, and Yukio Saijoh. 2002. “Establishment of Vertebrate Left-Right Asymmetry.” *Nature Reviews. Genetics* 3(2):103–13. doi: 10.1038/NRG732.
- Hashimoto, Masakazu, and H. Hamada Hiroshi. 2010. “Translation of Anterior-Posterior Polarity into Left-Right Polarity in the Mouse Embryo.” *Current Opinion in Genetics & Development* 20(4):433–37. doi: 10.1016/J.GDE.2010.04.002.
- Hirokawa, Nobutaka, Yosuke Tanaka, Yasushi Okada, and Sen Takeda. 2006. “Nodal Flow and the Generation of Left-Right Asymmetry.” *Cell* 125(1):33–45. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.002.
- Hodos, William, and Ann B. Butler. 1997. “Evolution of Sensory Pathways in Vertebrates.” *Brain, Behavior and Evolution* 50(4):189–97. doi: 10.1159/000113333.
- Hüsken, Ulrike, and Matthias Carl. 2013. “The Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway Establishes Neuroanatomical Asymmetries and Their Laterality.” *Mechanisms of Development* 130(6–8):330–35. doi: 10.1016/J.MOD.2012.09.002.
- Hüsken, Ulrike, Heather L. Stickney, Gaia Gestri, Isaac H. Bianco, Ana Faro, Rodrigo M. Young, Myriam Roussigne, Thomas A. Hawkins, Carlo A. Beretta, Irena Brinkmann, Alessio Paolini, Raquel Jacinto, Shahad Albadri, Elena Dreosti, Matina Tsalavouta, Quenten Schwarz, Florencia Cavodeassi, Anukampa K. Barth, Lu Wen, Bo Zhang, Patrick Blader, Emre Yaksi, Lucia Poggi, Mihaela Zigman, Shuo Lin, Stephen W. Wilson, and Matthias Carl. 2014. “Tcf7l2 Is Required for Left-Right Asymmetric Differentiation of Habenular Neurons.” *Current Biology* 24(19):2217–27. doi: 10.1016/j.cub.2014.08.006.
- Ito, Yuzuru, Tsutomu Oinuma, Kazuhiro Takano, Shinji Komazaki, Shuichi Obata, and Makoto Asashima. 2006. “CyNodal, the Japanese Newt Nodal-Related Gene, Is Expressed in the Left Side of the Lateral Plate Mesoderm and Diencephalon.” *Gene Expression Patterns* 6(3):294–98. doi: 10.1016/J.MODGEP.2005.07.008.

- Juan, H., and H. Hamada. 2001. “Roles of Nodal-Lefty Regulatory Loops in Embryonic Patterning of Vertebrates.” *Genes to Cells* 6(11):923–30. doi: 10.1046/J.1365-2443.2001.00481.X.
- Kajikawa, Eriko, Toru Miki, Masayoshi Takeda, Hiroshi Kiyonari, and Hiroshi Hamada. 2022. “Left-Right Asymmetric Expression of the Nodal-Lefty-Pitx2 Module in Developing Turtle Forebrain.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10:929808. doi: 10.3389/FCELL.2022.929808/BIBTEX.
- Kalueff, Allan V., Adam Michael Stewart, and Robert Gerlai. 2014. “Zebrafish as an Emerging Model for Studying Complex Brain Disorders.” *Trends in Pharmacological Sciences* 35(2):63–75. doi: 10.1016/J.TIPS.2013.12.002.
- Katoh, Takanobu A., Toshihiro Omori, Katsutoshi Mizuno, Xiaorei Sai, Katsura Minegishi, Yayoi Ikawa, Hiromi Nishimura, Takeshi Itabashi, Eriko Kajikawa, Sylvain Hiver, Atsuko H. Iwane, Takuji Ishikawa, Yasushi Okada, Takayuki Nishizaka, and Hiroshi Hamada. 2023. “Immotile Cilia Mechanically Sense the Direction of Fluid Flow for Left-Right Determination.” *Science* 379(6627):66–71. doi: 10.1126/science.abq8148.
- Kelly, Gregory, Richard Grose, Jue Zhang, Jin-San Zhang, Zhang J-s, Majid Mossahebi-Mohammadi, Meiyu Quan, and Xiaokun Li. 2020. “FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency. Front.” *Cell Dev. Biol* 8:79. doi: 10.3389/fcell.2020.00079.
- Kuan, Yung Shu, Sara Roberson, Courtney M. Akitake, Lea Fortuno, Joshua Gamse, Cecilia Moens, and Marnie E. Halpern. 2015. “Distinct Requirements for Wntless in Habenular Development.” *Developmental Biology* 406(2):117. doi: 10.1016/J.YDBIO.2015.06.006.
- Lagadec, Ronan, Laurent Laguerre, Arnaud Menuet, Anis Amara, Claire Rocancourt, Pierre Péricard, Benoît G. Godard, Maria Celina Rodicio, Isabel Rodriguez-Moldes, Hélène Mayeur, Quentin Rougemont, Sylvie Mazan, and Agnès Boutet. 2015. “The Ancestral Role of Nodal Signalling in Breaking L/R Symmetry in the Vertebrate Forebrain.” *Nature Communications* 2015 6:1 6(1):1–10. doi: 10.1038/ncomms7686.
- Lanoizelet, Maxence, Léo Michel, Ronan Lagadec, Hélène Mayeur, Lucile Guichard, Dany Séverac, Kyle Martin, Christophe Klopp, Sylvain Marcellini, Hector Castillo, Nicolas Pollet, Eva Candal, Mélanie Debiais-Thibaud, Catherine Boisvert, Bernard Billoud, Michael Schubert, Patrick Blader, and Sylvie Mazan. 2023. “Analysis of a Shark Reveals Ancient Habenular Asymmetries in Gnathostomes and Points to Wnt Regulation as a Driving Force in Their Diversification.” *BioRxiv* 2023.10.17.562666. doi: 10.1101/2023.10.17.562666.

- Leach, Emma L., Gratien Prefontaine, Peter L. Hurd, and Bernard J. Crespi. 2014. “The Imprinted Gene LRRTM1 Mediates Schizotypy and Handedness in a Nonclinical Population.” *Journal of Human Genetics* 59:332–36. doi: 10.1038/jhg.2014.30.
- Levin, Michael, and A. Richard Palmer. 2007. “Left-Right Patterning from the inside out: Widespread Evidence for Intracellular Control.” *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 29(3):271–87. doi: 10.1002/BIES.20545.
- Levin, Michael, Thorleif Thorlin, Kenneth R. Robinson, Taisaku Nogi, and Mark Mercola. 2002. “Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and Cell Membrane Potentials Comprise a Very Early Step in Left-Right Patterning.” *Cell* 111(1):77–89. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00939-X.
- Li, Peipei, Elizabeth Ensink, Sean Lang, Lee Marshall, Meghan Schilthuis, Jared Lamp, Irving Vega, and Viviane Labrie. 2020. “Hemispheric Asymmetry in the Human Brain and in Parkinson’s Disease Is Linked to Divergent Epigenetic Patterns in Neurons.” *Genome Biology* 2020 21:1 21(1):1–23. doi: 10.1186/S13059-020-01960-1.
- Lin, Shin Yi, and Rebecca D. Burdine. 2005. “Brain Asymmetry: Switching from Left to Right.” *Current Biology* 15(9). doi: 10.1016/J.CUB.2005.04.026.
- Little, Rosie B., and Dominic P. Norris. 2021. “Right, Left and Cilia: How Asymmetry Is Established.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 110:11–18. doi: 10.1016/J.SEMCDB.2020.06.003.
- Long, Sarah, Nadira Ahmad, and Michael Rebagliati. 2003. “The Zebrafish Nodal-Related Gene Southpaw Is Required for Visceral and Diencephalic Left-Right Asymmetry.” *Development* 130(11):2303–16. doi: 10.1242/DEV.00436.
- Lopes, A. F., P. Morais, M. Pimentel, R. Rosa, P. L. Munday, E. J. Gonçalves, and A. M. Faria. 2016. “Behavioural Lateralization and Shoaling Cohesion of Fish Larvae Altered under Ocean Acidification.” *Marine Biology* 163(12):1–10. doi: 10.1007/S00227-016-3026-4.
- Lubben, Noah, Elizabeth Ensink, Gerhard A. Coetzee, and Viviane Labrie. 2021. “The Enigma and Implications of Brain Hemispheric Asymmetry in Neurodegenerative Diseases.” *Brain Communications* 3(3). doi: 10.1093/BRAINCOMMS/FCAB211.
- Matsui, Takaaki, and Yasumasa Bessho. 2012. “Left-Right Asymmetry in Zebrafish.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(18):3069–77. doi: 10.1007/s00018-012-0985-6.
- McManus, I. C., N. Martin, G. F. Stubbings, E. M. K. Chung, and H. M. Mitchison. 2004. “Handedness and Situs Inversus in Primary Ciliary Dyskinesia.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271(1557):2579. doi: 10.1098/RSPB.2004.2881.

- Nonaka, Shigenori, Yosuke Tanaka, Yasushi Okada, Sen Takeda, Akihiro Harada, Yoshimitsu Kanai, Mizuho Kido, and Nobutaka Hirokawa. 1998. “Randomization of Left-Right Asymmetry Due to Loss of Nodal Cilia Generating Leftward Flow of Extraembryonic Fluid in Mice Lacking KIF3B Motor Protein.” *Cell* 95(6):829–37. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81705-5.
- Nonaka, Shigenori, Satoko Yoshida, Daisuke Watanabe, Shingo Ikeuchi, Tomonobu Goto, Wallace F. Marshall, and Hiroshi Hamada. 2005. “De Novo Formation of Left-Right Asymmetry by Posterior Tilt of Nodal Cilia.” *PLoS Biology* 3(8). doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.0030268.
- Norris, Dominic P. 2012. “Cilia, Calcium and the Basis of Left-Right Asymmetry.” *BMC Biology* 10(1):1–8. doi: 10.1186/1741-7007-10-102/FIGURES/3.
- Odate, Toru, Sen Takeda, Keishi Narita, and Toru Kawahara. 2016. “9 + 0 and 9 + 2 Cilia Are Randomly Dispersed in the Mouse Node.” *Microscopy* 65(2):119–26. doi: 10.1093/JMICRO/DFV352.
- Palma, Karina, Iskra A. Signore, Margarita M. Meynard, Jazmin Ibarra, Lorena Armijo-Weingart, Marcos Cayuleo, Steffen Härtel, and Miguel L. Concha. 2022. “Ontogenesis of the Asymmetric Parapineal Organ in the Zebrafish Epithalamus.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10:999265. doi: 10.3389/FCELL.2022.999265.
- Regan, Jennifer C., Miguel L. Concha, Myriam Roussigne, Claire Russell, and Stephen W. Wilson. 2009. “An Fgf8-Dependent Bistable Cell Migratory Event Establishes CNS Asymmetry.” *Neuron* 61:27–34. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.030.
- Reiter, Jeremy F., Barbara Tavares, Raquel Jacinto, Pedro Sampaio, Sara Pestana, Andreia Pinto, Andreia Vaz, Mónica Roxo-Rosa, Rui Gardner, Telma Lopes, Britta Schilling, Ian Henry, Leonor Saú De, and Susana Santos Lopes. 2017. “Notch/Her12 Signalling Modulates, Motile/Immotile Cilia Ratio Downstream of Foxj1a in Zebrafish Left-Right Organizer.” *eLife* 6:e25165. doi: 10.7554/eLife.25165.001.
- Rogers, Lesley J. 2021. “Brain Lateralization and Cognitive Capacity.” *Animals: An Open Access Journal from MDPI* 11(7). doi: 10.3390/ANI11071996.
- Roussigné, Myriam, Patrick Blader, and Stephen W. Wilson. 2012. “Breaking Symmetry: The Zebrafish as a Model for Understanding Left-Right Asymmetry in the Developing Brain.” *Developmental Neurobiology* 72(3):269–81. doi: 10.1002/DNEU.20885.

- Rugani, Rosa, Orsola Rosa Salva, Lucia Regolin, and Giorgio Vallortigara. 2015. "Brain Asymmetry Modulates Perception of Biological Motion in Newborn Chicks (*Gallus Gallus*)."
Behavioural Brain Research 290:1–7. doi: 10.1016/J.BBR.2015.04.032.
- Sampaio, Pedro, Rita R. Ferreira, Adán Guerrero, Petra Pintado, Bárbara Tavares, Joana Amaro, Andrew A. Smith, Thomas Montenegro-Johnson, David J. Smith, and Susana S. Lopes. 2014. "Left-Right Organizer Flow Dynamics: How Much Cilia Activity Reliably Yields Laterality?" *Developmental Cell* 29(6):716–28. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2014.04.030.
- Schier, Alexander F. 2003. "Nodal Signaling in Vertebrate Development." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19:589–621.
doi: 10.1146/ANNUREV.CELLBIO.19.041603.094522.
- Schmitz, Judith, Robert Kumsta, Dirk Moser, Onur Güntürkün, and Sebastian Ocklenburg. 2018. "DNA Methylation in Candidate Genes for Handedness Predicts Handedness Direction." *Laterality* 23(4):441–61. doi: 10.1080/1357650X.2017.1377726.
- Sha, Zhiqiang, Dick Schijven, Amaia Carrion-Castillo, Marc Joliot, Bernard Mazoyer, Simon E. Fisher, Fabrice Crivello, and Clyde Francks. 2021. "The Genetic Architecture of Structural Left–Right Asymmetry of the Human Brain." *Nat Hum Behav* 1226–1239
doi: 10.1038/s41562-021-01069-w.
- Shinohara, Kyosuke, and Hiroshi Hamada. 2017. "Cilia in Left-Right Symmetry Breaking." *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9(10):a028282 doi: 10.1101/cshperspect.a028282.
- Shiratori, Hidetaka, and Hiroshi Hamada. 2014. "TGF β Signaling in Establishing Left-Right Asymmetry." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 32:80–84.
doi: 10.1016/J.SEMCDB.2014.03.029.
- Snelson, Corey D., and Joshua T. Gamse. 2009. "Building an Asymmetric Brain: Development of the Zebrafish Epithalamus." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20(4):491.
doi: 10.1016/J.SEMCDB.2008.11.008.
- Song, Hai, Jianxin Hu, Wen Chen, Gene Elliott, Philipp Andre, Bo Gao, and Yingzi Yang. 2010. "Planar Cell Polarity Breaks Bilateral Symmetry by Controlling Ciliary Positioning." *Nature* 466(7304):378–82. doi: 10.1038/NATURE09129.
- Soukup, Vladimir, Luok Wen Yong, Tsai Ming Lu, Song Wei Huang, Zbynek Kozmik, and Jr Kai Yu. 2015. "The Nodal Signaling Pathway Controls Left-Right Asymmetric Development in *Amphioxus*." *EvoDevo* 6(1). doi: 10.1186/2041-9139-6-5.

- Stern, Claudio D. 2006. "Evolution of the Mechanisms That Establish the Embryonic Axes." *Current Opinion in Genetics & Development* 16(4):413–18. doi: 10.1016/J.GDE.2006.06.005.
- Tabin, Clifford J. 2006. "The Key to Left-Right Asymmetry." *Cell* 127(1):27–32. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.018.
- Tammen, Stephanie A., Simonetta Friso, and Sang Woon Choi. 2013. "Epigenetics: The Link between Nature and Nurture." *Molecular Aspects of Medicine* 34(4):753–64. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.018.
- Tanaka, Yosuke, Yasushi Okada, and Nobutaka Hirokawa. 2005. "FGF-Induced Vesicular Release of Sonic Hedgehog and Retinoic Acid in Leftward Nodal Flow Is Critical for Left–Right Determination." *Nature* 435:7039 435(7039):172–77. doi: 10.1038/nature03494.
- Taniguchi, Kazuto, and Hiroki Nishida. 2004. "Tracing Cell Fate in Brain Formation during Embryogenesis of the Ascidian *Halocynthia roretzi*." *Development, Growth & Differentiation* 46(2):163–80. doi: 10.1111/J.1440-169X.2004.00736.X.
- Varlet, Isabelle, and Elizabeth J. Robertson. 1997. "Left-Right Asymmetry in Vertebrates." *Current Opinion in Genetics & Development* 7(4):519–23. doi: 10.1016/S0959-437X(97)80080-9.
- Ventolini, Nicola, Enrico A. Ferrero, Stefano Sponza, Andrea Della Chiesa, Paolo Zucca, and Giorgio Vallortigara. 2005. "Laterality in the Wild: Preferential Hemifield Use during Predatory and Sexual Behaviour in the Black-Winged Stilt." *Animal Behaviour* 69(5):1077–84. doi: 10.1016/J.ANBEHAV.2004.09.003.
- Wu, Hao, Junjie Luo, Huimin Yu, Amir Rattner, Alisa Mo, Yanshu Wang, Philip M. Smallwood, Bracha Erlanger, Sarah J. Wheelan, and Jeremy Nathans. 2014. "Cellular Resolution Maps of X Chromosome Inactivation: Implications for Neural Development, Function, and Disease." *Neuron* 81(1):103–19. doi: 10.1016/J.NEURON.2013.10.051.
- Yun, Ye Rang, Jong Eun Won, Eunyi Jeon, Sujin Lee, Wonmo Kang, Hyejin Jo, Jun Hyeog Jang, Ueon Sang Shin, and Hae Won Kim. 2010. "Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration." *Journal of Tissue Engineering* 1(1):1–18. doi: 10.4061/2010/218142.
- Zhang, Bai bing, Yuan yuan Yao, He fei Zhang, Koichi Kawakami, and Jiu lin Du. 2017. "Left Habenula Mediates Light-Preference Behavior in Zebrafish via an Asymmetrical Visual Pathway." *Neuron* 93(4):914-928.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.011.