

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program/obor: Reprodukční a vývojová biologie



Anežka Kupková

Gastrocoelní střešní deska jako organizátor levo-pravé asymetrie jesetera

Gastrocoel roof plate as an organizer of left-right asymmetry in sturgeon

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze, 25. 7. 2024

.....

Anežka Kupková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli Mgr. Vladimíru Soukupovi, PhD. za odborné konzultace, cenné rady, trpělivost a čas při vedení této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Jindřichu Brejchovi, PhD za spolupráci, cenné informace a seznámení se statistickým zhodnocením při analýze cílií. Také děkuji Laboratoři elektronové mikroskopie na IMG AVČR za spolupráci ve studiu ultrastruktury cílií. Dále děkuji Mgr. Agátě Horáčkové za seznámení s řadou laboratorních technik a poskytnutí embryí kostlína a Mgr. Tomáši Suchánkovi za poskytnutí embryí bichira. Velký dík za pomoc při vypracovávání této práce patří i všem členům naší laboratoře. Na závěr bych chtěla poděkovat i mé rodině a přátelům za podporu během celé doby studia.

Abstrakt

Levo-pravá asymetrie je u obratlovců determinována přítomností dočasných embryonálních struktur nazývaných jako organizátory levo-pravé asymetrie. Tyto struktury jsou tvořeny ciliárními buňkami, jejichž cílie jsou pohyblivé. Na základě motility cílie generují levotočivý tok extracelulární tekutiny, který posléze spouští asymetrickou expresi genů z tzv. Nodal signální dráhy. Hlavními představiteli této kaskády jsou Nodal, Lefty a Pitx2, kteří jsou zodpovědní za levo-pravě asymetrickou stavbu vnitřních orgánů.

U paprskoploutvých ryb byl jako organizátor levo-pravé asymetrie popsán Kupfferův váček coby dutá kulovitá struktura. Tento organizátor byl však studován pouze na zástupcích skupiny Teleostei (dánio, medaka) a zdali se objevuje i u ostatních zástupců paprskoploutvých ryb, není doposud známo. Tato práce se zaměřuje na studium organizátoru levo-pravé asymetrie na doposud nezkoumaném druhu – jeseteru malém (*Acipenser ruthenus*) jako zástupci ne-teleostních paprskoploutvých ryb.

Na základě snímků z elektronového mikroskopu jsme pozorovali, že u jesetera se vyskytuje organizátor kapkovitého tvaru v blízkosti blastoporu a zároveň je tvořen ciliárními buňkami. Více než Kupfferově váčku se podobá spíše organizátoru levo-pravé asymetrie obojživelníků, kterým je gastrocoelní střešní deska. Práce analyzuje pozici a délku cílí a následnou přítomnost Nodal signální dráhy. Při farmakologické inhibici této dráhy dochází u jeseterů k poruchám stočení srdeční trubice a nepřítomnosti asymetrické exprese *Pitx2* v mozku. Testována byla také funkčnost H⁺K⁺-ATPázy, která se jeví nezbytná pro levo-pravou asymetrii ve stádiích blastuly, ale nikoliv ve stádiích s přítomným organizátorem.

Naše výsledky ukazují, že organizátor levo-pravé asymetrie u ne-teleostních paprskoploutvých ryb je gastrocoelní střešní deska, stejně jako u obojživelníků. Vývoj jesetera nese s vývojem obojživelníků mnoho společných znaků, více se odlišuje spíše s jeho blízkce příbuznou teleostní skupinou, kde byl jako organizátor levo-pravé asymetrie objeven Kupfferův váček. Rozšířenost gastrocoelní střešní desky u ne-teleostních paprskoploutvých ryb tedy přispívá k hypotéze o evolučním původu Kupfferova váčku z gastrocoelní střešní desky.

Klíčová slova: levo-pravá asymetrie, organizátor, gastrocoelní střešní deska, jeseter, cílie, Nodal signální dráha

Abstract

Left-right asymmetry in vertebrates is determined by the temporary embryonic structures called organizers of left-right asymmetry. These structures are formed by cells with motile cilia. Based on this motility, the cilia generate a leftward flow of extracellular fluid, which triggers asymmetric expression of genes that are part of the so-called Nodal signaling pathway. The main members of this cascade are Nodal, Lefty and Pitx2, which are responsible for the establishment of left-right asymmetric structure of internal organs.

In ray-finned fishes, a hollow spherical structure called Kupffer's vesicle has been described as the organizer of left-right asymmetry. However, this organizer has only been studied in members of the Teleostei group (zebrafish, medaka) and whether it also appears in other ray-finned fishes is still unknown. This thesis focuses on the study of the left-right organizer in the so far unexplored species – the sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) as a species of non-teleost ray-finned fishes.

Based on images from an electron microscope, we observed that the sturgeon organizer forms a teardrop shape near the blastopore and contains ciliated cells. Rather than Kupffer's vesicle, it resembles the left-right organizer of amphibians, i.e. the gastrocoel roof plate. This Diploma thesis analyzes the position and length of the cilia followed by the presence of the Nodal signaling pathway. Pharmacological inhibition of this pathway results in disorders in heart tube coiling and absence of asymmetric expression of *Pitx2* in the brain. The functionality of H⁺K⁺-ATPase was also tested and suggested that it is necessary for left-right asymmetry establishment during blastula stages, but not during stages with the organizer.

Our results show that like in amphibians the left-right organizer in non-teleost ray-finned fishes is the gastrocoel roof plate. The development of the sturgeon has many features in common with the development of amphibians, but it differs from closely related teleost group, where Kupffer's vesicle has been discovered. The presence of the gastrocoel roof plate in non-teleost ray-finned fishes thus contributes to the hypothesis of the evolutionary origin of the Kupffer's vesicle from gastrocoel roof plate.

Key words: left-right asymmetry, organizer, gastrocoel roof plate, sturgeon, cilia, Nodal signaling pathway

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Literární přehled | 3 |
| 2.1 | Gastrocoelní střešní deska jako organizátor levo-pravé asymetrie..... | 3 |
| 2.1.1 | Morfologie gastrocoelní střešní desky | 3 |
| 2.1.2 | Vznik a vývoj gastrocoelní střešní desky | 4 |
| 2.1.3 | Nezbytné faktory pro funkci gastrocoelní střešní desky a ciliogenezi..... | 5 |
| 2.2 | Cílie | 7 |
| 2.2.1 | Struktura cílie | 7 |
| 2.2.2 | Funkce cílí a vznik levostranného proudu | 8 |
| 2.2.3 | Hypotézy vnímání levostranného proudu..... | 9 |
| 2.3 | Nodal signální dráha | 11 |
| 2.3.1 | Nodal | 11 |
| 2.3.2 | Lefty | 14 |
| 2.3.3 | Pitx2 | 14 |
| 2.3.4 | Cerberus | 15 |
| 2.3.5 | Interakce Nodal a Lefty jako reakčně-difuzní model..... | 15 |
| 2.4 | Levo-pravá asymetrie vnitřních orgánů..... | 16 |
| 2.4.1 | Srdce..... | 17 |
| 2.4.2 | Střeva a slezina..... | 17 |
| 2.4.3 | Mozek..... | 18 |
| 2.5 | Organizátor levo-pravé asymetrie paprskoploutvých ryb..... | 19 |
| 2.5.1 | Kupfferův váček | 19 |
| 2.5.2 | Organizátor levo-pravé asymetrie ne-teleostních ryb | 20 |
| 3 | Hypotéza a cíle práce | 22 |
| 4 | Materiál a metody..... | 23 |
| 4.1 | Embrya..... | 23 |
| 4.2 | Fixace..... | 23 |
| 4.3 | Whole-mount imunofluorescenční barvení | 23 |
| 4.4 | Výroba jeseteří cDNA | 25 |
| 4.5 | Výroba mRNA prob..... | 25 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.6 | Whole-mount <i>in situ</i> hybridizace | 26 |
| 4.7 | Skenovací elektronová mikroskopie..... | 27 |
| 4.8 | Transmisní elektronová mikroskopie | 27 |
| 4.9 | Analýza cílů..... | 28 |
| 4.10 | Inhibiční experimenty | 29 |
| 4.11 | Focení a tvorba schémat | 29 |
| 5 | Výsledky..... | 30 |
| 5.1 | Organizátor levo-pravé asymetrie u jesetera malého..... | 30 |
| 5.2 | Cíle v organizátoru levo-pravé asymetrie jesetera | 32 |
| 5.3 | Přítomnost Nodal signální dráhy | 39 |
| 5.4 | Vliv H ⁺ K ⁺ -ATPázy na levo-pravou asymetrii jesetera..... | 44 |
| 5.5 | Zánik organizátoru levo-pravé asymetrie jesetera | 47 |
| 5.6 | Organizátor levo-pravé asymetrie paprskoploutvých ryb..... | 47 |
| 6 | Diskuze..... | 49 |
| 6.1 | Gastrocoelní střešní deska jako organizátor levo-pravé asymetrie jesetera | 49 |
| 6.2 | Cíle v gastrocoelní střešní desce jesetera | 50 |
| 6.3 | Nodal signální dráha v levo-pravé asymetrii jesetera..... | 53 |
| 6.4 | Protonové pumpy v levo-pravé asymetrii jesetera | 55 |
| 6.5 | Evoluce organizátoru levo-pravé asymetrie | 56 |
| 7 | Závěr..... | 58 |
| 8 | Seznam zkratek | 60 |
| 9 | Použitá literatura | 62 |

1 Úvod

Levo-pravou asymetrii můžeme pozorovat napříč celou živočišnou říší. U bezobratlých se jedná zejména o asymetricky stočenou ulitu hlemýžďů nebo asymetrická klepeta krabů. Pro obratlovce se levo-pravá asymetrie vyskytuje především u vnitřních orgánů jako je postavení srdce, laloky plic, stočení střev nebo funkce mozkových hemisfér. Tyto levo-pravé asymetrie vznikají během raného embryonálního vývoje. Nejčasnější asymetrie byly pozorovány u drápatky *Xenopus laevis* dokonce již ve dvoubuněčném stádiu. Jednalo se o asymetrický výskyt ATPáz v levé a pravé buňce (Levin et al., 2002).

Hlavní podíl na vzniku levo-pravé asymetrie se však přisuzuje až ve stádiích pozdní gastruly až časně neuruly, kdy se u embryí objevuje struktura označovaná jako organizátor levo-pravé asymetrie (Nonaka et al., 2002). Tento organizátor levo-pravé asymetrie se vyskytuje u všech skupin obratlovců. U teleostních ryb se nazývá Kupfferův váček (Kupffer, 1868), u obojživelníků gastrocoelní střešní deska (Blum et al., 2009a), u ptáků Hensenův uzel (Cooke, 1995) a u savců uzel (Bellomo et al., 1996).

Na všech těchto organizátorech (kromě Hensenova uzlu) se vyskytují cílie, které jsou pohyblivé. Cílie rotují kolem své osy a dávají vznik toku extracelulární tekutiny, který je nezbytný pro přenos signálu a následně asymetricky spuštěnou Nodal signální dráhu. Hlavními faktory této kaskády jsou Nodal, Lefty, Pitx2 a Cerberus, které díky své levo-pravé asymetrické expresi umožňují specifický vývoj levé a pravé poloviny těla a správnou orientaci orgánů (Blum et al., 2014). Normální postavení vnitřních orgánů označujeme jako *situs solitus* a zrcadlově převrácené jako *situs inversus*.

Přestože je funkce organizátorů levo-pravé asymetrie podobná, objevuje se u nich značná tvarová rozmanitost v rámci jednotlivých skupin obratlovců. Zajímavé je, že ačkoliv je u všech teleostních ryb organizátorem Kupfferův váček, u zástupců ne-teleostních skupin ryb by se organizátor měl spíše podobat gastrocoelní střešní desce čili organizátoru obojživelníků. Byl však pozorován pouze u jediného druhu ne-teleostního zástupce, a to u jesetera bílého (*Acipenser transmontanus*) v devadesátých letech, a to jen na pár snímcích z elektronového mikroskopu (Bolker, 1993). Od té doby nebyl u této skupiny podrobněji zkoumán.

Cílem této diplomové práce je studium levo-pravého organizátoru se zaměřením na ne-teleostní paprskoploutvé ryby s využitím především druhu jesetera malého (*Acipenser ruthenus*). Práce popisuje tento organizátor a porovnává jej se zástupci obojživelníků, a to

nejen s drápatkou, ale také axolotlem mexickým čili zástupcem ocasatých obojživelníků, u kterého tato struktura také nebyla podrobně zkoumána.

Dále se práce věnuje vývoji levo-pravého organizátoru na morfologické úrovni, kde klade důraz na vývoj, funkci a tranzici cílů, které umožňují vznik levostranného proudu. Potvrzuje i roli členů Nodal signální kaskády v determinaci levo-pravé asymetrie a přenos této dráhy na levou stranu asymetrických orgánů. Práce taktéž naznačuje zánik gastrocoelní střešní desky a porovnání jesetera malého s ostatními zástupci ne-teleostních paprskoploutvých ryb, pro doplnění evolučních souvislostí organizátorů levo-pravé asymetrie.

Tato studie ukazuje, že organizátorem levo-pravé asymetrie jesetera je gastrocoelní střešní deska. Na základě přítomnosti tohoto typu organizátoru u obojživelníků, ale také ostatních zástupců ne-teleostních paprskoploutvých ryb, ukazuje doposud nezkoumané aspekty v rámci těchto druhů a poukazuje na vysvětlení vzniku Kupfferova váčku coby organizátoru levo-pravé asymetrie u skupiny Teleostei.

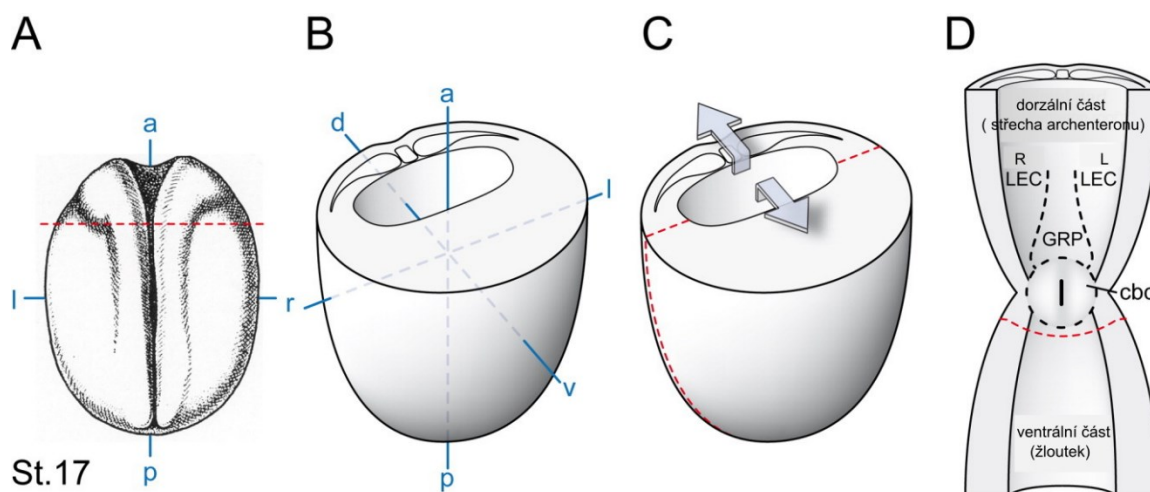
2 Literární přehled

2.1 Gastrocoelní střešní deska jako organizátor levo-pravé asymetrie

Stejně tak jako u ostatních skupin obratlovců, hraje u obojživelníků při specifikaci levé a pravé strany těla nepostradatelnou roli organizátor levo-pravé asymetrie. V tomto případě se jedná o tzv. gastrocoelní střešní desku (GRP, gastrocoel roof plate), což je embryonální struktura nacházející se v posteriorní části neuruly v blízkosti blastoporu, která je zároveň v kontaktu s dutinou (Schweickert et al., 2007). Tato dutina se nazývá archenteron a vzniká v průběhu gastrulace. Dalším označením pro archenteron je právě gastrocoel, což vysvětluje název pro gastrocoelní střešní desku, jakožto strukturu nacházející se na dorzální straně této dutiny (Blum et al., 2014).

2.1.1 Morfologie gastrocoelní střešní desky

Ačkoliv se přítomnost gastrocoelní střešní desky jako organizátoru levo-pravé asymetrie předpokládá u všech zástupců obojživelníků, pochopitelně byla popsána především na zástupcích rodu drápatek *Xenopus* (viz obr. 2.1) coby modelových druhů této skupiny (Blum et al. 2009b; Chien et al., 2018; Schweickert et al., 2007). Kromě drápatků byla GRP taktéž pozorována u žab *Ceratophrys stolzmanni*, *Engystomops randi*, *Epipedobates machalilla*, *Gastrotheca riobambae* (Saenz-Ponce et al., 2012) a dále navržena u axolotla mexického (*Ambystoma mexicanum*) (Blum et al., 2009a).



Obrázek 2.1 Pohled na umístění gastrocoelní střešní desky (GRP). A) Dorzální pohled na embryo drápatky ve stádiu 17, B) Embryo po odříznutí anteriorní části, C) / D) červená přerušovaná čára znázorňuje řez a šipky ukazují směr otevření embrya. Na obrázku D je pak vidět pohled do vnitřní dutiny. LEC = laterální entodermální lišta, R = pravá strana, L = levá strana, cbc = cirkuloblastoporální límec (převzato z Blum et al., 2009a).

U drápatky byla GRP popsána jako dočasná trojúhelníkovitá struktura tvořená superficiálním mezodermem. Buňky této skupiny mezodermu dávají v pozdějším vývoji vznik notochordu a somitů (Delarue et al., 1994; Shook et al., 2004). GRP se nachází na posteriorní části neuruly, tzn. ve stádiích 13 až 19, a tvoří ho více než 200 buněk. Posteriorně od GRP se postupně uzavírá blastoporus a na jeho ventrální straně se nachází dutina archenteronu (Schweickert et al., 2007).

Z buněk organizátorů vyrůstají cílie, které v průběhu vývoje mění svou délku, náklon a pozici. Nejprve cílie vyrůstají z centrální části buněk a později se přesouvají na posteriorní stranu (Hashimoto et al., 2010). Zároveň se cílie postupně prodlužují, u drápatky jsou ve stádiu 14 cílie dlouhé přibližně 1-2 μ m, zatímco ve stádiu 19 již měří 5 μ m (Schweickert et al., 2007).

Každá buňka je opatřena pouze jednou cílí a tyto cílie jsou zároveň pohyblivé. Díky své rotaci opisují tvar elipsy a umožňují tak vznik extracelulárního proudu tekutiny, která se vyskytuje v již zmiňované dutině. Tento tok je vždy levostranný a je nezbytný pro aktivaci Nodal signální dráhy. Jedná se o kaskádu genů, která umožňuje správnou determinaci levo-pravé orientace těla (Essner et al., 2002; Nonaka et al., 2002). Pro správně orientovaný pohyb cílí je právě nezbytný již zmiňovaný posteriorní náklon, a to přibližně v rozmezí 35 až 40 stupňů (Nonaka et al., 2005; Okada et al., 2005).

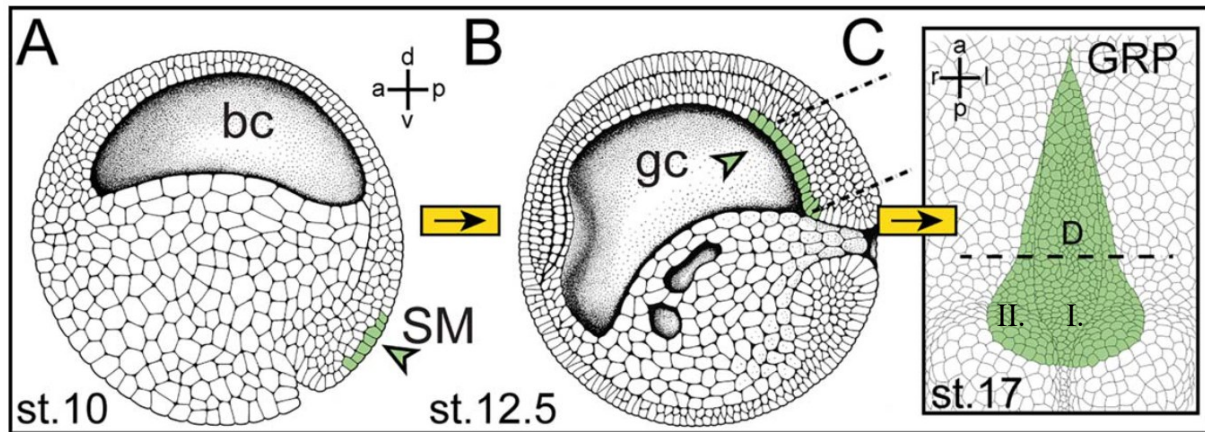
2.1.2 Vznik a vývoj gastrocoelní střešní desky

Před začátkem gastrulace jsou buňky budoucí GRP součástí tzv. budoucího superficiálního mezodermu. V průběhu gastrulace buňky tohoto mezodermu involují přes dorzální ret blastoporu do vnitřku embrya, kde kopírují vnější vrstvu. Pro migraci buněk je nutná přítomnost fibronektinu a dále účast kadherinů, které umožňují adhezi migrujícím buňkám (Keller et al., 1985; Koin et al., 1996; Shook et al., 2004).

GRP se začíná objevovat na začátku neurulace v posteriorní části embrya v oblasti umístěné anteriorně od blastoporu. GRP u drápatky můžeme dále rozdělit na dvě oblasti. I. oblast se nachází pod chordou dorsalis a skládá se z menších buněk, které jsou monociliární. Po obou stranách oblasti I. pak můžeme pozorovat oblasti II., které se vyskytují ventrálně od somitů a tvoří je větší buňky (obr. 2.2) (Shook et al., 2004). U drápatky bývá gastrocoelní střešní deska charakteristická především ve stádiích 14–19 (Schweickert et al., 2007).

Buňky této struktury následně nezanikají, ale prostřednictvím své migrace dávají vznik dalším mezodermálním strukturám jako jsou chorda a somity (Shook et al., 2004). Tato

migrace a následná funkce buněk organizátoru je u obratlovců konzervována a jejich epitelo-mesenchymální tranzice byla podrobněji popsána například u zániku Kupfferova váčku (organizátoru teleostei) dánia pruhovaného (Ikeda et al., 2022).



Obrázek 2.2 A) Embryo drápatky ve stádiu 10, bc = blastocoel, SM = superficiální mezoderm, označený zeleně, který je předchůdcem gastrocoelní střešní desky. B) Embryo drápatky ve stádiu 12.5, gc = gastrocoel, zeleně je označená gastrocoelní střešní deska. C) GRP (D) = gastrocoelní střešní deska z ventrálního pohledu u stádia 17, v GRP je znázorněna oblast I. a II. (převzato a upraveno podle Tisler et al., 2016).

2.1.3 Nezbytné faktory pro funkci gastrocoelní střešní desky a ciliogenezi

Ještě před vznikem morfologicky viditelné levo-pravé asymetrie, dochází u embryí k rozdílné expresi genů v budoucí levé a pravé straně. Nejranější levo-pravě asymetrická exprese byla u drápatky pozorována již ve dvoubuněčném stádiu, a to konkrétně v H^+ -V-ATPáze (Adams et al., 2006). Její funkce tkví v rozdílném membránovém potenciálu a pH u jednotlivých buněk. Zároveň reguluje následný výskyt proteinu Xnr1 (Nodal 1) a lokalizaci serotoninu. Při inhibici H^+ -V-ATPázy concanamycinem vznikají u embryí heterotaxie (poruchy v levo-pravé asymetrii orgánů). Vliv této ATPázy pro levo-pravou asymetrii se taktéž potvrdil u embryí dánia a kuřete (Adams et al., 2006). Stejně asymetricky byla ve dvoubuněčném stádiu drápatky nalezena i další protonová pumpa $H+K^+$ -ATPáza (Levin et al., 2002).

Již zmíněný serotonin je následně důležitým aktérem ve specifikaci superficiálního mezodermu a umožňuje jeho dorzalizaci. Zdá se, že také kooperuje s Wnt/ β -catenin dráhou (Beyer et al., 2012). Obecně Wnt signální dráha je nezbytnou součástí organizátorů levo-pravé asymetrie. Účastní se zde dvě Wnt signální dráhy, a to Wnt/PCP (planar cell polarity) a Wnt/ β -catenin signální dráha. Tyto dráhy fungují přes aktivaci proteinu

Dishevelled. PCP dráha umožňuje posteriorní polarizaci cílů, kdežto dráha s β -cateninem je nezbytná pro jejich pohyblivost (Caron et al., 2012; Park et al., 2008). Součástí Wnt/ β -catenin dráhy je *Wnt11b*, jehož exprese začíná již na začátku gastrulace v superficiálním mezodermu, ze kterého následně vzniká právě GRP. Při knockdownu *Wnt11b* bylo u drápatky pozorováno narušení levostranného proudu a ztráta exprese efektorového genu dráhy levo-pravé asymetrie *Pitx2c* (Walentek et al., 2013).

Wnt/ β -catenin signální dráha reguluje expresi *Foxj1*. Při injekci morfolínem proti *Foxj1* dochází ke zkrácení cílů a snížení jejich počtu. *Foxj1* zároveň indukuje expresi genů, které dávají vznik jednotlivým proteinům cílů, a tudíž zajišťuje jejich motilitu (Stubbs et al., 2008). Na specifikaci GRP a ciliogenezi se dále podílí *Dmrt2* (doublesex and mab3-related transcription factor 2). Při ošetření embryí morfolínem dochází k poruchám ve specifikaci organizátoru, vzniku kratších cílů a snížené expresi *Foxj1* (Tingler et al., 2022).

Co se týče délky cílů, jako další zúčastněnou dráhou pro správnou délku byla popsána FGF (fibroblast growth factor) dráha. Funkci zajišťuje prostřednictvím FGF8, FGF24 a receptoru FGFR1. Při inhibici tohoto receptoru dochází ke vzniku kratších cílů, což má samozřejmě velký vliv na jejich funkci (Neugebauer et al., 2009). FGF dráha také působí při specifikaci GRP a interaguje s vápenatým kanálem PKD2 (polycystin-2), se kterým zajišťuje správnou expresi Nodal signální dráhy. Předpokládá se, že tato funkce FGF dráhy je u obratlovců konzervovaná (Schneider et al., 2019).

V neposlední řadě hraje v levo-pravé asymetrii nezbytnou roli Notch signální dráha. Downstream této dráhy je totiž protein Nodal, který je důležitý pro správnou délku cílů a tím pádem i rychlost následného levotočivého proudu. U Notch mutantů dochází ke zkrácení cílů, a naopak hyperaktivaci této dráhy k ciliárnímu prodloužení (Lopes et al., 2010; Tözser et al., 2015).

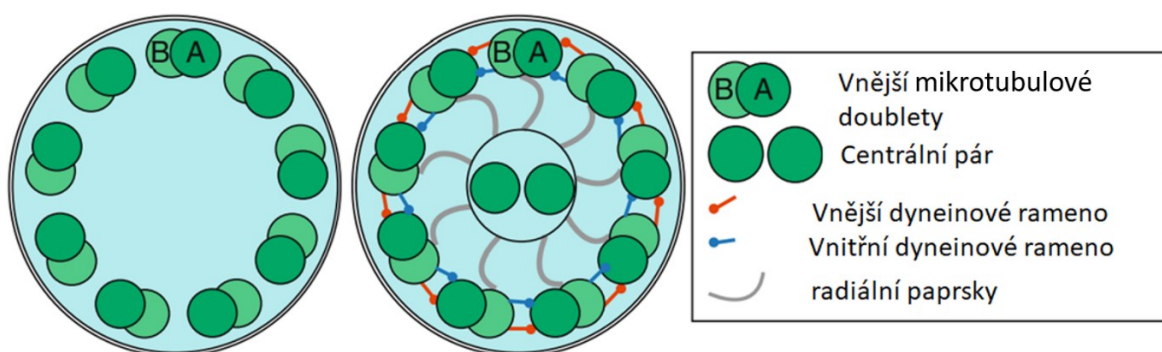
Pro formaci cílů je také důležitý IP3 (inositol 1,4,5-trisfosfát), který na základě své aktivace pomocí fosfolipázy C uvolňuje vápenaté ionty z endoplazmatického retikula. Experimenty na embryích drápatky ukázaly, že protilátková blokáda IP3 vede ke snížení počtu cílů a způsobuje randomizaci levo-pravé osy těla (Hatayama et al., 2011).

2.2 Cílie

Cílie, česky označovány také jako řasinky, jsou buněčné struktury založené především na mikrotubulech. Buňky mohou mít jednu či více těchto struktur. Dále se cílie liší především svou délkou a pohyblivostí. U obratlovců se pohyblivé cílie vyskytují v celé řadě tělních soustav jako je dýchací, reprodukční nebo trávicí. Taktéž je jejich přítomnost nezbytná již v embryonálních stádiích, a to právě v organizátorech levo-pravé asymetrie, kde svou rotací aktivují levostranný proud (Blum et al., 2014). Nepřítomnost nebo nepohyblivost cílí způsobuje řadu onemocnění. Jedním z nejznámějších je tzv. Kartagenerův syndrom, který u jedinců způsobuje poruchy plodnosti, dýchacích cest a defekty levo-pravé asymetrie (Afzelius, 1976).

2.2.1 Struktura cílie

Hlavní součást všech cílí jsou především mikrotubulové doublety. Jeden takový doublet je složen ze dvou spojených kruhů, z nichž jeden obsahuje třináct a druhý deset mikrotubulů, které vyrůstají z bazálního tělíska. Nejčastější počet těchto doubletů v jedné cíli bývá devět doubletů + jeden centrální pár složený ze dvou nespojených kruhů (9+2) anebo pouze devět doubletů bez centrálního páru (9+0) (obr. 2.3) (Basu a Brueckner, 2008; Gibbons a Grimstone, 1960).



Obrázek 2.3 Seskupení mikrotubulových doubletů 9+0 a 9+2 u cílie. A) kruh s třinácti mikrotubuly, B) kruh s deseti mikrotubuly. Červeně a modře jsou označena dyneinová ramena a šedě radiální paprsky (převzato z Basu a Brueckner, 2008).

Největším rozdílem mezi těmito dvěma variantami je především pohyblivost cílie. Obvykle při konformaci 9+2 jsou cílie pohyblivé, zatímco cílie s konformací 9+0 bývají nepohyblivé. Tento rozdíl je způsobený tím, že v cíliích s 9+2 mikrotubulovými doublety se obvykle vyskytují radiální paprsky a dyneinové struktury, které zajišťují pohyblivost, kdežto u 9+0 chybí (Satir a Christensen, 2008). Toto pravidlo však neplatí vždy, například u medaky japonské (*Oryzias latipes*) mají cílie organizátoru levo-pravé asymetrie konformaci 9+0 a přesto obsahují dyneiny, a tudíž jsou pohyblivé (Okada et al., 2005). Existuje i jiná konformace než výše zmiňované, a to 9+4 mikrotubulových doubletů, která byla pozorována v uzlu králíka (Feistel a Blum, 2006).

V pohyblivých cíliích je také nezbytná přítomnost členů kinezinové rodiny, a to KIF proteinů. Jejich funkce byla pozorována již během ciliogeneze a u hotových cílů zajišťují správnou pohyblivost společně s dyneinem Lrd (left-right dynein) (Nonaka et al., 1998; Supp et al., 1997). Dalším dyneinem v cíliích organizátoru je Dnah5, mutací tohoto proteinu vznikají defekty v levo-pravé asymetrii těla (Olbrich et al., 2002).

2.2.2 Funkce cílů a vznik levostranného proudu

Pro správnou funkci organizátoru levo-pravé asymetrie jsou nezbytné pohyblivé cílie, které rotují po směru hodinových ručiček frekvencí přibližně 10 Hz. Vzhledem k tomu, že kolem organizátoru se nachází extracelulární tekutina, cílie svým pohybem dávají vznik levostrannému proudu. Tento proud následně zajišťuje aktivaci Nodal signální dráhy, která je zodpovědná za stanovení levo-pravé osy (Nonaka et al. 2002; Okada et al. 2005).

Během vývoje dochází k postupné posteriorizaci cílů a zároveň k jejich náklonu směrem k posterioru. Při tomto náklonu se mění úhel elipsy, kterou cílie cirkulují a dochází ke zefektivnění levostranného proudu (Djenoune et al., 2023; Okada et al., 2005). Zdá se, že pro levo-pravou asymetrii je důležitá i orientace bazálního tělíska. V pozdějších stádiích organizátoru myši značně převládá postavení mateřské centrioly na levé straně a dceřiné na pravé straně tělíska. Toto postavení centriol je navíc závislé na pohyblivosti cílů. Dokud nejsou cílie pohyblivé, levo-pravé postavení tělísek je neusměrněné. Překvapivě je však tato levo-pravá orientace nezávislá na levostranném proudu. Pokud vytvoříme uměle vytvořený proud v opačném směru, pozice centriol se nezmění. Mateřská centriola se v pozdějších stádiích organizátoru nachází posteriorně od své dceřiné centrioly, což vede k myšlence, že právě ona určuje směr postupné posteriorizaci cílů (Yoke et al. 2023).

U drápatky bylo v gastrocoelní střešní desce pozorováno necelých tři sta cílů. Při injekci roztoku 1,5% methylcelulózy do prostoru, do kterého cíle vystupují, tedy archenteronu, byly u embryí drápatky pozorovány defekty levo-pravé asymetrie v důsledku zpomalení levotočivého proudu (Schweickert et al., 2007).

Pro aktivaci Nodal signální dráhy v organizátoru hrají velmi zásadní roli vápenaté kanály. Díky toku se totiž asymetricky přenášejí vápenaté ionty, které mohou interagovat s těmito kanály (Yoshida et al. 2012). Na cílech organizátoru se vyskytují komplexy transmembránových proteinů Pkd1 a Pkd2, které jsou vzájemně propojeny přes C-terminální doménu a vytvářejí tak kanál pro vstup vápníku (Mochizuki et al. 1996; Kamura et al. 2011).

Funkce tohoto komplexu byla podrobněji zkoumána především pro klinické studie onemocnění polycystických ledvin. Kanály s Pkd1/2 komplexem jsou schopny vnímat levostranný extracelulární proud a umožňují intracelulární zvýšení vápenatých iontů usměrněným tokem tekutiny – tedy na levé straně organizátoru (Nauli et al., 2003).

Na organizátoru dále byla také prokázána funkce CaMK-II (Ca²⁺/CaM dependentní protein kináza), která byla nalezena na anteriorní levé straně organizátoru. Tato kináza je aktivována při zvýšeném množství intracelulárních vápenatých iontů proniklých cíliemi a z endoplazmatického retikula. Zároveň interaguje s receptorem RYR3 (ryanodinový receptor 3) a vápenaté ionty pak mohou proudit přes mezerové spoje (gap junctions) do okolních buněk organizátoru (Francescato et al., 2010). Všechny tyto faktory zajišťují vnímání asymetrické přítomnosti Nodal proteinů. O tom, jakým konkrétním způsobem k tomu dochází, se ale stále vedou debaty (Norris, 2012).

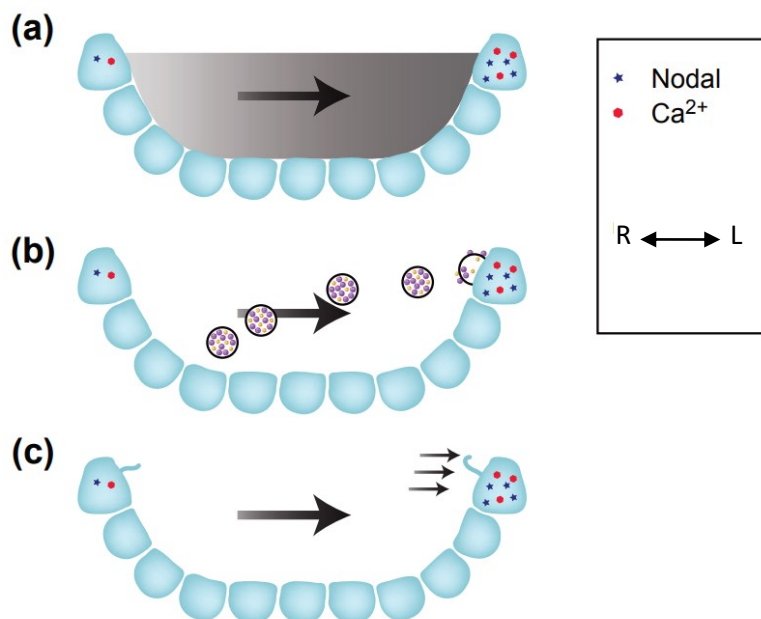
2.2.3 Hypotézy vnímání levostranného proudu

Vlivem levostranného proudu dochází k asymetrickému výskytu proteinu Nodal a vápenatých iontů. Existuje však více teorií a názorů, jak je tento tok vnímán samotnými buňkami organizátoru (obr. 2.4) (Norris 2012; Nonaka et al. 1998).

První model vnímání levostranného proudu je chemosenzitivní model. Ten předpokládá, že vlivem extracelulárního toku dochází k asymetrické koncentraci hypotetického morfogenu (proteinu Nodal), tedy jeho přítomnost na levé straně je signifikantně vyšší než na pravé (Nonaka et al. 1998; Okada et al. 2005). Experimenty na organizátoru králíka a myši naznačují, že při levostranném proudu dochází ke vzniku koncentračního gradientu a akumulaci proteinů velkých přibližně 20 kDa na levé straně. Menší proteiny podléhají difuzi a větší se pohybují příliš pomalu, takže pro ně není proud natolik zásadní (Okada et al. 2005).

Dalším modelem je model nodal váčků NVP (nodal vesicular parcels), uvnitř kterých se nacházejí morfogeny, konkrétně se jedná o Sonic Hedgehog a kyselinu retinovou. NVP se díky levostrannému proudu pohybují směrem k levé straně organizátoru a při jejich dotyku s cílií se váčky rozpadají. Předpokládá se, že tato aktivace NVP je pod vlivem FGF signální dráhy (Tanaka et al. 2005).

Třetím a v současnosti nejvíce zastávaným modelem je mechanosenzitivní model, také označovaný jako model dvou cílií. Tento model bere v úvahu existenci dvou typů cílií v organizátoru – pohyblivých a nepohyblivých. Studie na myších embryích ukázaly přítomnost obou těchto cílií v organizátoru levo-pravé asymetrie (tedy uzlu). V uzlu převažovalo množství pohyblivých cílií a nepohyblivé byly pozorovány při okrajích organizátoru, a to především v anteriorní části. Zatímco dlouhé pohyblivé cílie díky své rotaci zajišťují levostranný proud, krátké nepohyblivé cílie obsahují právě výše zmíněné polycystinové kanály a zajišťují vnímání proudu (McGrath et al., 2003; Tabin a Vogan, 2003).



Obrázek 2.4 Tři hypotézy vnímání levotstranného proudu buňkami organizátoru. a) Chemosenzitivní model neboli morfogenový model je založen na asymetrické přítomnosti morfogenu (vyšší koncentrace na levé straně) způsobené levotstranným proudem. b) Model nodal váčků NVP (nodal vesicular parcels), které obsahují morfogeny. Vlivem proudu směřují k levé straně organizátoru a při dotyku s cílií se rozpadají. c) Mechanosenzitivní model neboli model dvou cílií, při kterém existují dva typy cílií: pohyblivé, které zajišťují levostranný proud a nepohyblivé, které zajišťují vnímání proudu (převzato z Norris 2012).

Zdá se, že k diferenciaci těchto typů cílií dochází již během gastrulace. Během involuce na buňky GRP působí rozdílný tlak vzhledem k jejich výsledné pozici. Buňky v mediální části tohoto organizátoru se protahují směrem k anterioru a objevují se u nich dlouhé pohyblivé

cílie, kdežto u laterálně umístěných buněk není tlak natolik velký a vznikají zde krátké nepohyblivé cílie. U drápatky bylo ukázáno, že delší cílie se vyskytují nejvíce v mediální rovině organizátoru, zatímco krátké cílie v pravé i levé laterální části (což odpovídá oblastem I. a II. obr. 2.2C) (Chien et al., 2018).

Co se týče polycystinových kanálů, byly také nalezeny v cíliích Kupfferova váčku dánia. Předpokládá se, že pro aktivaci těchto kanálů je nejprve u nepohyblivých cílií potřebná mechanická stimulace, až díky které dochází k intracelulárnímu toku vápenatých iontů (Djenoune et al., 2023). Nejnovější studie také poukazují na důležitost proteinu Pkd1L1 v polycystinových kanálech. Ačkoliv exprese genů pro Pkd1L1 není asymetrická, s pomocí FGF signální dráhy je jejich lokalita dominantní na levé straně organizátoru. Pkd1L1 následně interaguje s proteinem Nodal, což by právě mohlo vést k asymetrickému toku vápenatých iontů na levé straně organizátoru levo-pravé asymetrie (Tanaka et al. 2023).

2.3 Nodal signální dráha

Jak bylo již zmíněno výše, díky extracelulárnímu levostrannému proudu dochází k asymetrické expresi genů tzv. Nodal signální dráhy. I když se u různých druhů vyskytuje odlišný počet homologů genů této dráhy, jedná se o konzervovanou signální kaskádu vyskytující se u všech skupin obratlovců. Mezi hlavními zástupci Nodal dráhy patří proteiny Nodal, Lefty a Pitx2¹, které se později nacházejí v celé levé polovině těla. Naopak na pravé straně se setkáváme s inhibítorem proteinu Nodal, který patří do rodiny DAN/Cerberus (Blum et al., 2014; Schier a Shen, 2000).

2.3.1 Nodal

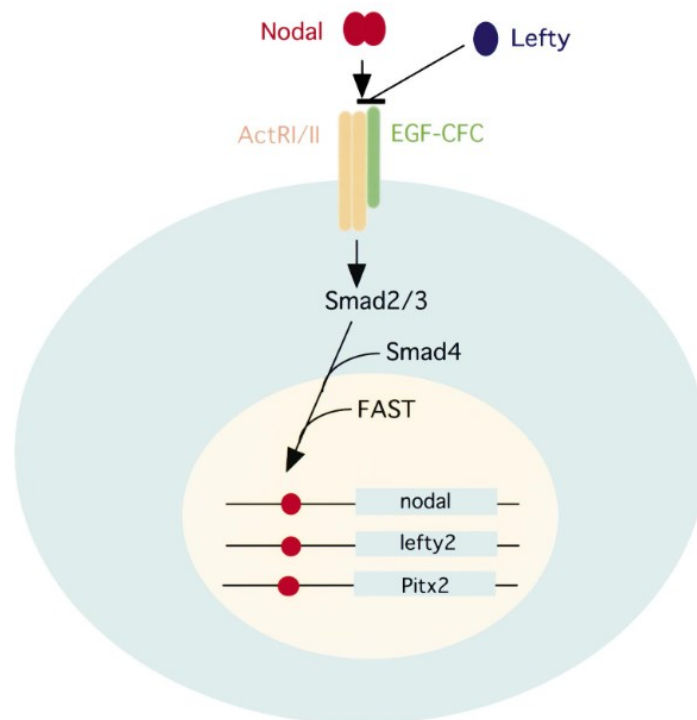
Proteiny Nodal jsou cytokiny, které patří do nadrodiny TGF β (transforming growth factor β), což jsou proteiny nasedající na serin/threoninové kinázy (obr. 2.5) (Zhou et al., 1993). V tomto případě se jedná o Aktivinový receptor I (ActRIB/ALK4) a Aktivinový receptor II (ActRIIA nebo ActRIIB). Ty spolu vytvářejí dimery a díky extracelulárnímu nasednutí ligandu Nodal u nich dochází k fosforylaci (Germain et al., 2000; Oh a Li, 1997; Thisse a Thisse, 1999). Zároveň interagují se svým koreceptorem EGF-CFC (Epidermal

¹ Názvy genů a proteinů Nodal signální dráhy nejsou v literatuře sjednoceny, co se týče velkého/malého písmena na začátku. Běžně se uvádí velké písmeno hovoříme-li o zástupci u myši nebo drápatky a malé u zástupců skupiny Teleostei.

growth factor – Cripto1 FRL1 Cryptic) (Gritsman et al., 1999). Aktivinové receptory pak následně fosforylují dimer proteinu Smad2/3, který interaguje s dimerem proteinu Smad4. Tento komplex Smad proteinů posléze vstupuje do jádra, kde aktivuje transkripční faktor FoxH1 (dříve označován jako Fast), který zahajuje expresi genů *Nodal*, *Lefty* a *Pitx2* (Juan a Hamada, 2001; Osada et al., 2000; Yang et al., 1998).

Nodal se v určení levo-pravé asymetrie vyskytuje vždy pouze na levé straně, a to díky přítomnosti jeho proteinových inhibitorů *Lefty* a *Cerberus*. Zároveň aktivuje expresi downstream genu pro faktor *Pitx2*, který se tedy nachází na stejné straně (Hojo et al., 2007; Piedra et al., 1998).

Nodal byl popsán u myši jako protein vznikající z preproproteinu, který je následně štěpen konvertázami *Spc1* a *Spc4* (Beck et al., 2002). Kromě levo-pravé asymetrie je Nodal nezbytný například při formování mezodermu a entodermu. Jeho exprese byla pozorována již ve stádiu gastruly a následně v primitivním proužku (Conlon et al., 1994).



Obrázek 2.5 Nodal signální kaskáda. Nodal nasedá na Aktivinové receptory I a II (ActRI/II) a zároveň je tato interakce inhibována proteinem *Lefty*. Aktivinové receptory s pomocí EGF-CFC fosforylují Smad2/3, které následně tvoří komplex se Smad4. Tento komplex následně vstupuje do jádra, kde aktivuje transkripční faktor Fast/FoxH1, který umožňuje expresi genů *Nodal*, *Lefty* a *Pitx2* (převzato z Juan a Hamada, 2001).

U jednotlivých skupin obratlovců se objevuje odlišné množství homologů Nodal. Velmi známými jsou například homology pro Nodal u teleostů – squint, cyclops a southpaw (Long et al., 2003; Rebagliati et al., 1998; Soroldoni et al., 2007). U této skupiny se všechny tři dříve či později podílejí na určení levo-pravé asymetrie těla, což ale není pravidlem u ostatních obratlovců.

U drápatky bylo popsáno šest homologních genů pro protein Nodal – *Xnr1*, *Xnr2*, *Xnr3*, *Xnr4*, *Xnr5* a *Xnr6* (Jones et al., 1995; Joseph a Melton, 1997; Onuma et al., 2002; Smith et al., 1995). Zdá se, že na indukci levo-pravé asymetrie se však podílí pouze *Xnr1*, ostatní plní jiné důležité funkce během vývoje. Exprese *Xnr2* se společně s *Xnr1* začíná objevovat již v pozdním stádiu blastuly. Následně se exprimují v oblasti dorzální marginální zóny během gastrulace jako faktory nezbytné pro dorzalizaci a indukci mezodermu (Jones et al., 1995). Podobně tak *Xnr3* se začíná objevovat v pozdní fázi blastuly a během gastrulace se jeho exprese přesouvá do oblasti organizátoru gastrulace, tzn. dorzálního rtu blastoporu. *Xnr3* je striktně exprimován pouze v epitelu této struktury. Buňky, které během gastrulace involují, jeho expresi ztrácejí (Smith et al., 1995).

Exprese *Xnr4* byla pozorována již od stádia střední blastuly a během gastrulace se naopak vyskytuje u involujících buněk (Joseph a Melton, 1997). *Xnr5* a *Xnr6* se stejně jako *Xnr4* začínají exprimovat ve stádiích střední blastuly, nacházejí se na vegetálním pólu, a to i v oblasti Niewkoopova centra, tedy centra indukujícího vznik organizátoru gastrulace. Významně se také podílejí na vzniku entodermu. Co se týče *Xnr5*, i když se přímo neúčastní asymetrické exprese v organizátoru, u jedinců s narušenou expresí byly pozorovány laterální defekty srdce. Důvodem je vzájemná interakce Nodal genů, kdy *Xnr5* reguluje expresi *Xnr1* (Tadjuidje et al., 2016). Pro vznik mezodermu se pak uplatňují všechny tyto Nodal homology kromě *Xnr3* (Takahashi et al., 2000).

Zaměříme-li se ale striktně na úlohu Nodal genů pro vznik levo-pravé asymetrie těla, je pro nás důležitý především homolog *Xnr1*, který jako jediný vykazuje levo-pravě asymetrickou expresi. *Xnr1* se asymetricky exprimuje v levé laterální mezodermální destičce drápatky. Předpokládá se, že tato asymetrická exprese je závislá na dorzálních strukturách, jako je chorda, které zabraňují expresi *Xnr1* na pravé straně (Lohr et al., 1997).

2.3.2 Lefty

Stejně tak jako Nodal, Lefty je součástí nadrodiny TGF β . Lefty se taktéž vyskytuje pouze na levé straně (Meno et al., 1996). Nasedá na Aktivinové receptory II a EGF-CFC, čímž zabraňuje nasednutí proteinu Nodal (Juan a Hamada, 2001). U jednotlivých druhů se liší počet homologů genů *Lefty*. U teleostního zástupce dánia pruhovaného (*Danio rerio*) byly popsány *lefty1* a *lefty2*, přičemž oba se podílejí na determinaci levo-pravé asymetrie těla (Bisgrove et al., 1999). Naopak další zástupce této skupiny, medaka japonská (*Oryzias latipes*), má pouze jeden *lefty* plnící úlohy za oba homology (Soroldoni et al., 2007).

Nezávisle na teleostní skupině, *Lefty1* a *Lefty2* vznikly i u savčího zástupce, tedy myši. Předpokládá se, že tyto homology myši vznikly genovou duplikací, jelikož se oba nacházejí na chromozomu 1 a stejně jako u dánia mají oba dva důležitou roli v levo-pravé asymetrii. *Lefty1* se exprimuje především na levé a ventrální straně neurální trubice, zatímco *Lefty2* se exprimuje hlavně v levé laterální mezodermální destičce. U *situs inversus* mutantů byla exprese genů *Lefty* pozorována bilaterálně, nebo naopak pouze na pravé straně. Stejně tak jako u myši, i u drápatky byly popsány dva homology *Lefty1* a *Lefty2* (Meno et al., 1997).

2.3.3 Pitx2

Faktor Pitx2 patří mezi tzv. bicoid-related homeobox transkripční faktory a je exprimován v několika stupních vývoje. Na základě přítomnosti Nodal a Sonic Hedhehog se vyskytuje v levé laterální mezodermální destičce. Jeho exprese pokračuje i v pozdějším vývoji, kdy už exprese genu *Nodal* vyhasne, a to v asymetrických orgánech jako je srdce nebo střevo (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998). Na embryích kuřete a drápatky byly provedeny experimenty, kdy byly ektopicky injikovány Sonic Hedgehog a Nodal do pravé laterální mezodermální destičky a následně byla provedena *in situ* hybridizace, která ukázala bilaterální expresi *Pitx2* (Ryan et al., 1998). Naopak při blokaci exprese *Pitx2* u embryí drápatky dochází k laterálním defektům. Pitx2 tak funguje jako závěrečný aktér Nodal signální dráhy, který zajišťuje finální levo-pravou identitu jednotlivých orgánů. Navzdory těmto tvrzením však není úplně jasné, jak dochází k tranzici Pitx2 z laterální mezodermální destičky do jednotlivých orgánů (Campioni et al., 1999).

U myši a drápatky byly popsány tři izoformy Pitx2 – Pitx2a, Pitx2b a Pitx2c. Pouze izoforma Pitx2c však byla pozorována v levé laterální mezodermální destičce, srdci a střevě (Schweickert et al., 2000). U drápatky byla exprese *Pitx2a* a *Pitx2c* společně s *Pitx1*

pozorována při vzniku ektodermálních orgánů, jako jsou cementové žlázy, hypofýza a stomodeum (Schweickert et al. 2001).

Mimo jiné, mutace v genu *Pitx2* je také spojována s Axenfeld-Riegerovým syndromem. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění objevující se i u člověka. Jedinci trpící tímto syndromem vykazují například kraniofaciální, dentální nebo okulární defekty, a tak bližší identifikace dráhy spojené s *Pitx2* může napomoci porozumění vzniku tohoto syndromu (Alward et al., 1998; Semina et al., 1996).

2.3.4 Cerberus

Na rozdíl od všech předešlých faktorů, *Cerberus* geny se exprimují zásadně na pravé straně organizátoru (Piccolo et al., 1999). Jsou součástí Cerberus/DAN rodiny, která hraje roli inhibitorů signálních molekul a vyznačuje se přítomností cysteinového uzlu. Cerberus proteiny fungují jako antagonisti BMP, Wnt a TGF β ligandů a jsou nezbytné pro identitu hlavových struktur (Hsu et al., 1998). Díky těmto interakcím působí jako inhibitory trupového mezodermu a při injikačních experimentech byly prokázány jejich schopnosti tvorby ektopických hlavových struktur (Piccolo et al., 1999).

Zaměříme-li se na *Cerberus* geny u modelových druhů, u myši byl popsán *Cerberus-like2/Dand5* (Marques et al., 2004) a u dánie *charon* (Hashimoto et al., 2004). U drápatky byl *Cerberus* gen pojmenován *Coco*, což je název odvozený od španělského slova pro hlavu, který právě poukazuje na jeho funkci. Exprese *Coco* byla pozorována již maternálně v animální části embrya až po období gastrulace. Jeho přítomnost jakožto inhibitoru BMP je důležitá pro blokaci mezodermálních faktorů v dorzálním ektodermu, kde se následně vytvoří nervová trubice (Bell et al., 2003).

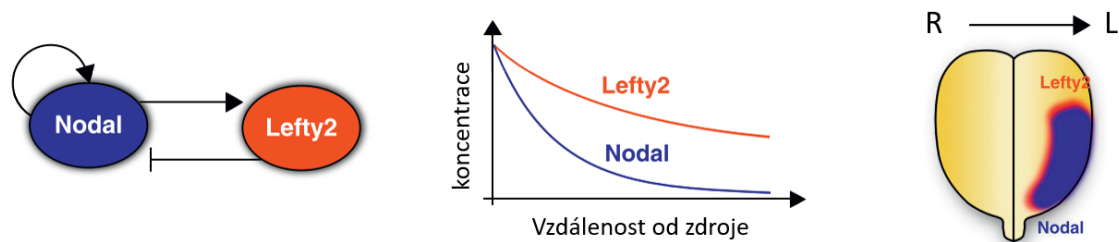
Co se týče exprese *Coco* v gastrocoelní střešní desce drápatky, byla pozorována intenzivně ve stádiích 14–15, tedy období, kdy v organizátoru vzniká levostranný proud, a ve stádiích 21–22, kdy už je proud ztracen. Při knockdownu *Coco* dochází k rozšíření *Xnr1* na pravou stranu organizátoru, což vede k laterálním defektům (Schweickert et al., 2010).

2.3.5 Interakce Nodal a Lefty jako reakčně-difuzní model

U všech organizátorů levo-pravé asymetrie se *Nodal* začíná exprimovat v organizátoru, a to nejprve na obou stranách a až později pouze na levé straně. Na pravé straně organizátoru je *Nodal* inhibován jeho antagonistou Cerberus (Hojo et al., 2007). Během vývoje organizátor

levo-pravé asymetrie postupně zaniká a Nodal se přesouvá do levé laterální mezodermální destičky. Zde Nodal hraje roli aktivátoru genů *Pitx2*, *Lefty* a sebe samého. *Lefty* funguje jako inhibitor exprese genu *Nodal* a má rychlejší difuzi, díky které zabraňuje výskytu proteinů Nodal na pravé straně, čímž zajistí že se všichni členové Nodal dráhy vyskytují pouze na té levé (Kawasumi et al., 2011; Nakamura et al., 2006).

Interakce mezi proteiny Nodal a *Lefty* funguje na základě tzv. reakčně-difuzního modelu (obr. 2.6). Tento model navržený geniálním matematikem a analytikem Alanem Turingem se uplatňuje v celé řadě biologických jevů. Je založený na přítomnosti dvou činitelů – aktivátoru a inhibitoru. Aktivátor aktivuje sebe samého a zároveň i svůj inhibitor, zatímco inhibitor inhibuje aktivátor a má rychlejší difuzi. Díky této interakci se inhibitor v nejvyšší koncentraci vyskytuje společně s nejvyšší koncentrací aktivátoru a díky difuzi tato koncentrace klesá pomaleji než koncentrace aktivátoru (Turing, 1952). V tomto případě se tedy Nodal nachází v pozici aktivátoru a *Lefty* jeho inhibitoru, který zajistí, že Nodal zůstane pouze na levé straně, kde řídí vývoj levostranných orgánů (Marcon a Sharpe, 2012).



Obrázek 2.6. Reakčně-difuzní model v levo-pravé asymetrii (převzato z Marcon and Sharpe 2012)

2.4 Levo-pravá asymetrie vnitřních orgánů

Po zániku organizátoru se Nodal objevuje v levé laterální mezodermální destičce, kde interaguje s *Lefty* a *Pitx2*. Následně je dráha rozšířena do celé levé poloviny těla. V tomto období u embryí začínají vznikat vnitřní orgány. Pro jejich levo-pravou orientaci se u levostranných orgánů a na levé straně asymetrických orgánů exprimuje především faktor *Pitx2*, který umožňuje jejich správnou identitu (Campiono et al., 1999; Ryan et al., 1998).

2.4.1 Srdce

Počátek vývoje srdce nastává na konci gastrulace, kdy se kardiálně předurčený mezoderm přesouvá směrem k anterioru a vytváří dvě oddělené populace primárního srdečního pole (popsáno u kuřete). Již v tomto období můžeme pozorovat levo-pravé asymetrie, a to v rámci asymetrické exprese genů v těchto polích. Následně dochází ke spojení levého a pravého srdečního pole a zároveň se zde připojuje sekundární/anteriorní pole, které bylo opět vytvořeno z mezodermálních buněk (Ramsdell, 2005).

Další asymetrický proces ve vývoji srdce je stáčení srdeční trubice. Nejprve dochází k pravostrannému stočení za vzniku smyčky. U myši bylo ukázáno, že na tomto stočení srdce se podílí gen *eHand*, který je exprimovaný nejprve bilaterálně a poté pouze na levé straně. Tato exprese je pod kontrolou homeobox genu *Nkx2-5*, bez kterého dochází k laterálním defektům srdce (Biben a Harvey, 1997). Stejně tak jako *eHand*, v srdeční trubici je nezbytná exprese *Pitx2*, který se také exprimuje nejprve bilaterálně a poté na levé straně srdeční trubice. Tato asymetrická exprese *Pitx2* u drápatky začíná již při vývoji srdeční trubice a ve stádiu 30 obklopuje celou levou část srdce (Ryan et al., 1998). Dále se ukazuje, že pro vývoj srdce je důležitý Notch 3, který díky své asymetrické expresi moduluje stočení srdeční trubice (Bonnelykke et al., 2024).

2.4.2 Střeva a slezina

Co se týče původu střeva a trávicí trubice obecně, tak se vyznačuje především svým entodermálním původem (vyjma začátku a konce trávicí trubice). Podobně jako u srdce i trávicí soustava má v embryích nejprve podobu duté trubice. Ke stáčení dochází především v zadní části předního střeva, kde následně vzniká žaludek, a ve středním střevě. Právě tato místa se vyznačují expresí *Pitx2*, který zajišťuje správnou polaritu stáčení. První smyčka se u drápatky vytváří ve stádiu 31 a je orientována na levou stranu v oblasti budoucího žaludku (Campione et al., 1999).

Ve stádiu 37 se v oblasti středního střeva začíná bilaterálně exprimovat *Nkx2-5*. Tato exprese během vývoje slábne na pravé straně a ve stádiu 40 se u drápatky nachází pouze na levé straně. Díky této expresi vznikají v této oblasti na levé straně trubice primordiální buňky sleziny, ze kterých později vzniká tento imunitně nepostradatelný orgán (Patterson et al., 2000). Narušení asymetrické exprese Nodal genů a regulace stáčení trubice následně vedou k různým formám heterodoxie, jako je například asplenie (slezina zcela chybí) nebo polysplenie (výskyt více než jedné sleziny) (Bartram et al., 2005).

2.4.3 Mozek

S levo-pravou asymetrií se také setkáváme v porovnání levé a pravé hemisféry mozku, a to v rámci jejich odlišné funkce. Asymetrie mozku se však objevují nejen na této funkční úrovni, ale i na úrovni morfologické, a to především v oblasti epithalamu. Epithalamus je tvořen strukturami, které se podílejí na koordinaci nálady, cyklech spánku a bdělosti a vnímání bolesti (Guglielmotti a Cristino, 2006). V této specifické oblasti mezimozku se mimo jiné nacházejí habenulární jádra a pineální komplex (Concha a Wilson, 2001).

Symetrie habenul se liší u různých skupin obratlovců. Levo-pravá asymetrie habenulárních jader se objevuje především u zástupců chrupavčitých a paprskoploutvých ryb (Lanoizelet et al., 2023). Tyto asymetrie jsou zároveň kolokalizovány s Nodal signální dráhou, kde dochází k expresi *Pitx2* v levé části habenuly. Expresní i morfologická asymetrie byla nalezena u teleostních zástupců dánia a medaky. U dánia byly nalezeny asymetrické jak habenuly, tak i pineální komplex. U mutantů s absencí nebo bilaterální expresí genů Nodal dráhy, však překvapivě nedocházelo k symetrii těchto struktur, ale k náhodnému určení jedné a druhé strany (Concha et al., 2000). Stejně tak byla ukázána asymetrická exprese *pitx2* v epithalamu medaky (Soukup et al., 2018). Přestože se u medaky a dánia setkáváme s expresí genů stejné dráhy, bylo u medaky v porovnání s dániem nalezeno několik asymetricky exprimovaných genů, které mají odlišnou expresi u dánia (Palma et al., 2022).

Podíváme-li se na zástupce obojživelníků, tak asymetrie v epithalamu byly ukázány na zástupcích rodu *Rana* (Morgan et al., 1973). Překvapivě tyto levo-pravé asymetrie nebyly nalezeny u rodu *Xenopus*, což se mimo jiné spojuje s nepřítomností Nodal dráhy v jejich mozku (Lanoizelet et al., 2023).

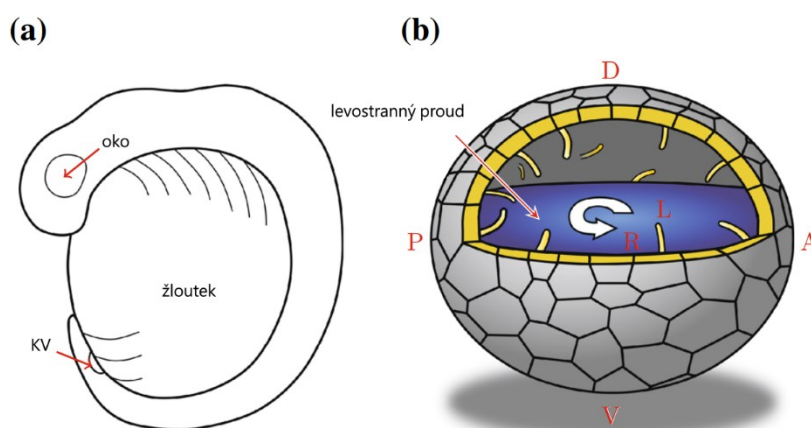
Expresé této dráhy byla také popsána i v epithalamu želv s tím rozdílem, že zde nebyla pozorována žádná morfologická asymetrie, ale pouze expresní (Kajikawa et al., 2022). Asymetrie v epithalamické oblasti byla důkladně zkoumána i u zástupců žraloků. Na druhou stranu, co se týče savců, jsou zde habenulární jádra epithalamu symetrická. Nebyla zde nalezena ani asymetrická exprese *Pitx2* a předpokládá se, že se vzniku této struktury neúčastní a během evoluce byla ztracena (Lagadec et al. 2015; Lanoizelet et al., 2023).

2.5 Organizátor levo-pravé asymetrie paprskoploutvých ryb

Doposud jsme se zaměřovali především na gastrocoelní střešní desku drápatky, tedy zástupce obojživelníků, ale předpokládá se, že tento organizátor levo-pravé asymetrie by se měl nacházet i u zástupců ne-teleostních druhů paprskoploutvých ryb (Bolker, 1993). Tato časně se odvětvující skupina ryb se oproti teleostní skupině odlišuje již během časného vývoje. Pro ne-teleostní ryby je typické holoblastické rýhování a gastrulace involucí, čímž se právě podobají vývoji obojživelníků (Cooper a Virta, 2007; Shook et al., 2004; Takeuchi et al., 2009). Naproti tomu u teleostních ryb se setkáváme s meroblastickým rýhováním a gastrulací pomocí epibolie (Concha a Reig, 2022; Cooper a Virta, 2007). Teleostei mají obecně velmi odlišný vývoj a celou řadu velmi odvozených znaků, což se přikládá celogenomové duplikaci, ke které došlo u společného předka této linie (Sato a Nishida, 2010).

2.5.1 Kupfferův váček

Kupfferův váček (KV) byl pojmenován podle svého objevitele Carla Wilhelma von Kupffera, který jej pozoroval již v devatenáctém století. Jedná se o dutou kulovitou strukturu vyskytující se pouze u zástupců Teleostei (Brummett a Dumont, 1978; Kupffer, 1868). Kupfferův váček je, stejně tak jako ostatní organizátory levo-pravé asymetrie, tvořen ciliárními buňkami, zodpovědnými za vytvoření levostranného proudu (obr. 2.7) (Essner et al., 2005).



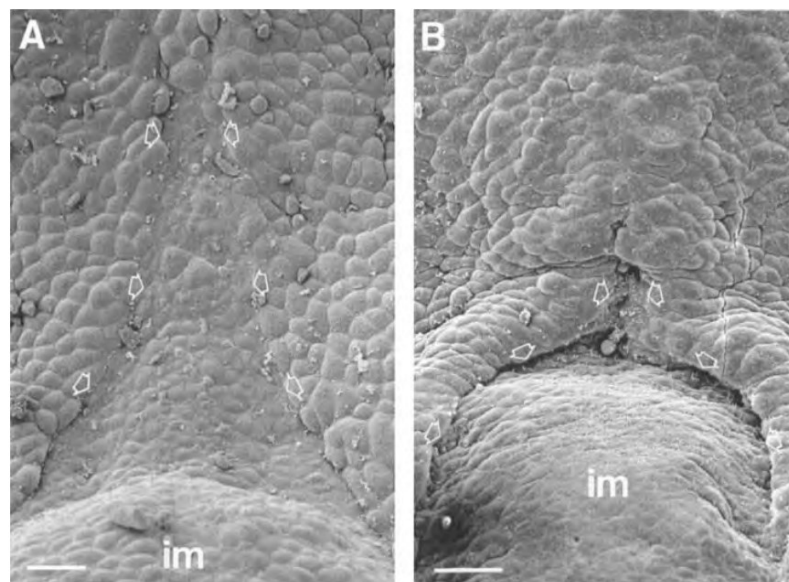
Obrázek 2.7. Kupfferův váček u dánía pruhovaného. (a) Pozice Kupfferova váčku (KV) v rámci celého embrya. (b) Struktura Kupfferova váčku s vyznačením cílií (žlutě) a levostranného proudu. (převzato z Montenegro-Johnson et al. 2016)

KV pochází z tzv. dorsal forerunner cells, což jsou buňky, které jsou odvozeny z povrchového epitelu a během vývoje vstupují involucí dovnitř embrya (Warga a Kane, 2018). U fundula mumiového a medaky japonské byly ciliární buňky KV pozorovány pouze na dorzální straně embrya (Brummett a Dumont, 1978; Okada et al., 2005). Naproti tomu u dánía pruhovaného se setkáváme s nejvíce odvozeným stavem, kde nacházíme ciliární buňky i na ventrální straně, tvoří tudíž celý vnitřní povrch KV. Díky tomuto uspořádání dochází v KV dánía ke vzniku více proudů, ten majoritní je však vždy levotočivý, díky asymetrickému uspořádání cílií (Kreiling et al., 2007).

Buňky Kupfferova vakuolu po splnění své funkce podstupují epitelo-mesenchymální tranzici a přispívají ke vzniku chordy a somitů (Ikeda et al. 2022).

2.5.2 Organizátor levo-pravé asymetrie ne-teleostních ryb

Do ne-teleostní skupiny paprskoploutvých ryb řadíme bichiry (Cladistia), jesetery (Chondrostei), kaprouny (Ginglymodi) a kostlíny (Halecomorphi). Ani u jedné ze jmenovaných skupin ale nebyl organizátor levo-pravé asymetrie podrobně zkoumán. Existuje pouze pár fotografií z devadesátých let (obr. 2.8), a to u jesetera bílého, kde můžeme vidět strukturu připomínající gastrocoelní střešní desku obojživelníků (obr. 2.7) (Bolker, 1993).



Obrázek 2.8 SEM fotografie střechny archenteronu v posteriorní oblasti jesetera bílého. A) stádium 21, B) stádium 25. im = involující materiál, také šipky znázorňují směr involuce entodermu, měřítko = 25 μ m. (převzato z Bolker 1993)

Předpoklad, že by u těchto ryb mohl být organizátor levo-pravé asymetrie odpovídající spíše tomu u obojživelníků, a ne Kupfferově váčku, podporuje jejich společný časný vývoj s obojživelníky. Na pozorování organizátoru levo-pravé asymetrie u ostatních ne-teleostních paprskoploutvých ryb se však doposud nikdo nezaměřoval (Cooper a Virta, 2007).

Ve studii zabývající se evolucí levo-pravé asymetrie navrhuje, že gastrocoelní střešní deska je něco jako předchůdce Kupfferova váčku, čili jeho původní stav, ze kterého se u Teleostei KV vyvinul (Blum et al., 2009b). Této teorii také přispívá fakt, že právě u Teleostei došlo k třetí celogenomové duplikaci, která umožnila specifikaci nově vzniklých paralogů pro tvorbu nových struktur (Glasauer a Neuhaus, 2014). K průkaznosti této hypotézy je v současné době nedostatek dat a jsou potřeba následné studie ukazující organizátor levo-pravé asymetrie u ne-teleostních paprskoploutvých ryb prokazující jeho funkci, podobnost s organizátorem obojživelníků a porovnání jednotlivě se odvětvujících linií těchto ryb.

3 Hypotéza a cíle práce

Hypotéza

Organizátor levo-pravé asymetrie ne-teleostních paprskoploutvých ryb je velmi odlišný v porovnání s Kupfferovým váčkem u teleostei a podobá se spíše organizátoru obojživelníků čili gastrocoelní střešní desce (GRP).

Cíle práce

1. Popsat morfologii a funkci organizátoru levo-pravé asymetrie u jesetera malého, jako druhu na pomezí embryonálního vývoje teleostních ryb a obojživelníků
2. Prokázat roli cílů v organizátoru levo-pravé asymetrie u jesetera
3. Otestovat přítomnost a funkci Nodal signální dráhy u tohoto druhu

4 Materiál a metody

4.1 Embrya

Embrya jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) ve stádiích několika buněk byly dovezeny do akvarijských chovů (katedra zoologie, Přírodovědecké fakulty UK) díky spolupráci s doc. Ing. Martinem Pšeničkou, PhD. z Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického na Fakultě rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích sídlící ve Vodňanech. Jeseteří embrya byla umístěna do plastových nádrží s roztokem E2 s přítomností penicilinu a streptomycinu pro ochranu před plísněmi a bakteriemi a byla ponechána vývoji v místnosti při teplotě 18 °C. Embryonální stádia jeseterů byla určována podle tabulky od Dettlaff et al.1993.

Embrya axolotla mexického (*Ambystoma mexicanum*) byla získána z našich vlastních chovů na katedře zoologie, embrya kostlína mexického (*Atractosteus tropicus*) (dovezených z Villahermosa, Tabasco, Mexiko) mi byla věnována Mgr. Agátou Horáčkovou a embrya bichira senegalského (*Polypterus senegalus*) (z chovů na katedře zoologie) Mgr. Tomášem Suchánkem.

4.2 Fixace

Požadovaná vývojová stádia byla anestetizována pomocí MS-222 (Tricaine methanesulfonate, Serva), byl jim odebrán gelovitý obal a poté byla fixována v 4% PFA (paraformaldehydu) pufrovaným 0,1M PBS (phosphate buffered saline). Část embryí byla ponechána v 4% PFA a skladována při 4 °C. Zbytek materiálu byl v PFA pouze přes noc a následující den byl převeden do PBS a vzestupnou řadou (25%, 50%, 75%, 100%) po 10 minutových intervalech do methanolu, ve kterém byl skladován při teplotě -20 °C.

4.3 Whole-mount imunofluorescenční barvení

Embryonální materiál ve stádiích 22–25 fixovaný v 4% PFA byl přemístěn do Petriho misky s PBS, kde byla mechanicky odstraněna žloutková část embryí (viz obr. 2.1), aby bylo možné sledovat fluorescenční signál. Dále byla provedena dehydratace vzestupnou řadou po 10 minutách do methanolu (25%, 50%, 75%, 2x 100%) a fixace v Dent's fixative (30 % methanol,

70 % DMSO) po dobu 1 hodiny. Následně proběhla inkubace v Dent's bleach (Dent's fixative : 30% H₂O₂ = 2 : 1) přes noc v pokojové teplotě. Druhý den byl materiál 3x promyt v roztoku PBS + 0,4% Triton v časových intervalech po 20 minutách a poté inkubován 1 hodinu v antibody dilution buffer (PBS + 0,4% Triton + 4% bovine serum albumin). Následně už byl materiál inkubován v primárních protilátkách po dobu 2 až 10 dnů ve 4 °C. Po inkubaci byl materiál opět 3x promyt v roztoku PBS + 0,4% Triton po 20 minutách a následně inkubován nejprve 1 hodinu v antibody dilution buffer a posléze 24 hodin v sekundárních protilátkách při pokojové teplotě. Následující den bylo provedeno stejné promytí jako předchozí den a embryonální materiál byl zalit 87% glycerolem přes noc, ve kterém byl pak umístěn na podložní sklíčka s jamkou a následně pozorován pod fluorescenčním mikroskopem.

Tabulka 4.1 Vyzkoušené protilátky

| Protilátka | Výrobce | Katalogové číslo | Biologický zdroj | Koncentrace | Dostatečný signál |
|----------------------------|----------------|------------------|----------------------|--------------|-------------------|
| anti-ac. α -tubulin | Merck | T6793 | myš | 1:500 | Ano |
| anti-ac. α -tubulin | Cell signaling | D2063 | králík | 1:500 | Ano |
| anti- β -actin | Merck | A1978 | myš | 1:500; 1:250 | Ne |
| Phalloidin 488 | Thermo Fisher | A12379 | muchomůrka zelená | 1:500; 1:250 | Ne |
| Phalloidin 594 | Thermo Fisher | A12381 | muchomůrka zelená | 1:500; 1:250 | Ne |
| anti- β -catenin | Thermo Fisher | PA5-16429 | králík | 1:500; 1:250 | Ne |
| anti- β -catenin | Merck | 05-665 | králík | 1:500; 1:250 | Ne |
| anti-E-cadherin | Thermo Fisher | 13-1900 | krysa | 1:500; 1:250 | Ne |
| anti-pSmad2 | Bio-Techne | 3108T | králík | 1:500; 1:250 | Ne |
| anti-Pitx2 | Bio-Techne | AF7388 | ovce | 1:500; 1:250 | Ne |

4.4 Výroba jeseteří cDNA

Jeseteří RNA skladována v -80 °C byla rozmrazena na ledu. Pro výrobu cDNA z RNA byl použit kit SuperScript IV Vilo (Thermo Fisher). Posléze byla změřena čistota na NanoDropu a cDNA byla skladována při teplotě -20 °C.

4.5 Výroba mRNA prob

Na základě assemblovaného transkriptomu jesetera malého (Stundl et al., 2022) byly navrženy primery pro Nodal a Lefty. Primery pro Pitx2 již byly publikovány (Minarik et al., 2017). K reverse primerům byla připojena sekvence pro nasedání SP6 RNA polymerázy podle tabulky 4.2.

Tabulka 4.2 Sekvence primerů

| gen | forward primer | SP6 pol. + reverse primer |
|-------|--------------------------|--|
| Pitx2 | ATGCAGCCCTACGA AGACAT | ATTTAGGTGACACTATAGTGAGTTGCAAGTGT CCCTA |
| Nodal | CTACCATTCCCACG ATCGCA | ATTTAGGTGACACTATAGTGATTTCTCGTGATG GCGGAG |
| Lefty | TGAGGTGCCCAA ATCCAGA | ATTTAGGTGACACTATAGTGATTGAGTCCAGGTG AGCTCC |

PCR reakce byla provedena programem Touchdown podle tabulky 4.3. Délka sekvence byla zkontrolována pomocí elektroforézy. PCR produkt byl pročištěn s využitím kitu PureLink PCR Purification (Thermo Fisher). Pro *in vitro* transkripci bylo podle pořadí smícháno 14µl PCR produktu; 2µl 10x transcription buffer; 2µl DIG-NTP mix; 2µl SP6 RNA polymeráza (všechny komponenty od Thermo Fisher) a inkubováno 2 hodiny v 37 °C. Poté bylo do mixu přidáno 2µl 0,2M EDTA; 2µl 4M LiCl a 75µl 96% ethanolu a ponecháno v -80 °C přes noc. Druhý den byla provedena centrifugace při 13 000 rcf ve 4 °C po dobu 15 minut, odstraněn supernatant a pelet opět centrifugován ve 4 °C, tentokrát 5 minut. Posléze byla peleta ponechána 15 minut sušit na pokojové teplotě a bylo přidáno 50µl dH₂O. Přítomnost próby byla testována pomocí elektroforézy a následně skladována v -80 °C.

Tabulka 4.3 Touchdown program PCR reakce

| krok | teplota (°C) | čas (min) |
|------|------------------------------|-----------|
| 1 | 94 | 1:00 |
| 2 | 94 | 0:30 |
| 3 | 62 (-0,5 °C každý cyklus) | 0:50 |
| 4 | 68 | 0:30 |
| 5 | zpět na krok 2 14x | |
| 6 | 94 | 0:30 |
| 7 | 55 | 0:30 |
| 8 | 68 | 3:00 |
| 9 | zpět na krok 6 20x | |
| 10 | 68 | 20:00 |
| 11 | 12 | ∞ |

4.6 Whole-mount *in situ* hybridizace

Embryonální materiál fixovaný v methanolu byl rehydratován po 15 minutách (25%, 50%, 75%, 100% PTw) do roztoku PTw (DEPC-treated PBS + 0,1% Tween 20) a následně opět po 15 minutách promyt v PTw. Embrya byla poté odbarvována v bleaching solution (na 10ml: 500µl formamid; 6,4ml dH₂O; 25µl 20x SSC; 2,8ml H₂O₂) 30 minut za světla lampičky a 3x promyta po 10 minutách v PTw. Posléze byla na 10 minut přidána Proteináza K (3µl/1ml PBS) a poté opět 3x promyto v PTw po 10 minutách. Postfixace byla provedena v roztoku 4% formaldehydu a 0,2% glutaraldehydu v PBS na 1 hodinu. Poté byla embrya znovu 3x promyta v PTw, tentokrát po 15 minutách a na 10 minut vložena do wash solution (na 50ml: 25ml 50% formamidu; 2,5ml 20x SCC; 25µl Tween-20 v dH₂O). V tomto roztoku byla embrya ohřata na 60 °C a ponechána 3 hodiny. Následně byla provedena hybridizace v hybridizačním roztoku (na 50ml: 5ml 10x salt solution; 25ml formamid; 5g dextran sulfát; 2,5ml t-RNA z kvasinek (Merck); 50x Denhardt's solution (Merck) v DEPC-treated PBS) s RNA próbou v 60 °C přes noc.

Následující den byla embrya 4x po 30 minutách promyta ve wash solution ohřátém na 65 °C a následně ve wash solution : MABT (na 50ml: 5ml 10x MAB; 50µl Tween-20; 4ml dH₂O) v poměru 1:1 do vychlazení na pokojovou teplotu. Dále byl 3x po 10 minutách vyměněn 100% MABT a poté přidán MABT: 20% ovčí sérum : blocking solution (Merck) (20g 10% Boehringer blocking reagent na 18ml MAB) v poměru 3:1:1 po dobu 2 – 3 hodin. Následně byla provedena inkubace v protilátkách (1µl protilátky anti-DIG-AP na 2ml MABT: 20% ovčí sérum: blocking solution) ve 4 °C přes noc.

Třetí den byla embrya promyta nejprve 2x po 5 minutách a posléze 6x po 1 hodině v MABT při pokojové teplotě a přes noc ponechána v MABT ve 4 °C. Čtvrtý den byla embrya 3x promyta v NTMT (na 50ml: 1ml 5M NaCl; 5ml 1M Tris pH 9,5; 2,5ml 1M MgCl₂; 250μl 20% Tween-20 v dH₂O), vložena do předem centrifugovaného BM purple (3000 rpm na 5 minut). Na závěr byl v krátkých časových intervalech kontrolován vznik dostatečného signálu a po jeho dosažení byla embrya 3x po 10 minutách promyta v PBS, fixována ve 4% PFA a skladována při teplotě 4 °C.

Příprava ostatních roztoků:

- DEPC-treated PBS : DEPC = 1000 : 1
- 10x salt solution (200ml): 23,38g NaCl; 2,8g Tris NaCl; 0,3g Tris base; 1,4g NaH₂PO₄ x H₂O; 1g Na₂HPO₄; 20ml 0,5 M EDTA v DEPC H₂O
- 20x SSC (1 litr): 175,3 g NaCl; 88,2g Na-citrát x 2H₂O v dH₂O
- 10x MAB (1 litr): 116g kyseliny jablečné; 87g NaCl v dH₂O

4.7 Skenovací elektronová mikroskopie

Embrya fixovaná v 4% PFA byla převedena do Petriho misek s 0,1% PBS, kde jim byla mechanicky odebrána žloutková část (podle obr. 2.1). Následně byl embryonální materiál dehydratován vzestupnou alkoholovou řadou po 20 minutách do ethanolu (25%, 50%, 75%, 2x 100%). Poté byl materiál umístěn do sušících kapslí v roztoku acetonu, ze kterého následně probíhalo sušení metodou CPD (Critical Point Drying – pomocí CO₂). Usušené části embryí byly přilepeny na kovová kolečka a pozlacena. Vzorčky byly následně fotografovány na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM) Jeol 6380 LV v Laboratoři elektronové mikroskopie na Přírodovědecké fakultě UK.

4.8 Transmisní elektronová mikroskopie

Embryonální materiál byl fixován ve 2,5% glutaraldehydu, 2% PFA v SB (Sorensen Buffer) a skladován při 4 °C. Následně byl z embryí mechanicky vyjmut pouze organizátor (podle obr. 2.1), který byl zalit 2% agarózou a 5x promyt v 0,1M SB v 15 minutových intervalech. Dále byl převeden do 1% OsO₄ v 0,1% SB a inkubován ve 4 °C po dobu 2-4 hodin.

Poté byly vzorky 5x promyty v dH₂O a přes noc ponechány v 1% uranyl acetátu v dH₂O opět přes noc při teplotě 4 °C. Následující den byly vzorky převedeny vzestupnou řadou po 30 minutách do ethanolu (30%, 50%, 70%, 90%, 2x 100%) a vloženy do epoxidové pryskyřice Quetol 561 (ethanol: pryskyřice = 3:1 – 1,5h; 1:1 – 2,5h; 1:1 přes noc; 100% pryskyřice 7h, 100% pryskyřice přes noc). Poté byly vzorky převedeny do Quetol-NSA (30min – 3h v pokojové teplotě; 3h v 37 °C, 72h v 60 °C) a fotografovány transmisním elektronovým mikroskopem (TEM) Jeol JEM 1400 Flash ve spolupráci s Laboratoří elektronové mikroskopie na Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky.

4.9 Analýza cílů

Snímky z SEM byly otevřeny v programu Fiji ImageJ (Schindelin et al., 2012) a kalibrovány velikostí pixelů na μm pomocí funkce „Set Scale“ s využitím měřítka získaného z mikroskopu. Obrázky byly následně otočeny tak, aby se u nich shodoval směr antero-posteriorní osy pomocí funkce „Rotate“. Od každého stádia bylo použito 5 snímků z 5 jedinců, které byly foceny při zvětšení 1600x. Pro analýzu bylo celkem použito 1703 buněk, 1406 cílů a 2 702 009 souřadnic obrysů buněk, které byly následně zpracovány v R studiu (R Core Team, 2000).

Měření délky cílů

Pomocí funkce „Make Line“ ve Fiji byly označeny všechny cíle ve všech stádiích jesetera a následně měřeny jejich délky. Měření byla vložena do excelové tabulky s vyznačením stádia a buňky. Z těchto dat bylo počítáno, jestli se liší délky cílů v jednotlivých stádiích s využitím lineárního smíšeného modelu (Bates et al., 2015). Tento model zahrnuje jedny neproměnné hodnoty (v tomto případě stádia) v korelaci s proměnnými hodnotami (délky) při opakovaném měření.

Pozice cílů v buňkách

Pomocí funkce „Make Rectangle“ ve Fiji, byl vložen čtverec o 3x3 pixelů v oblasti báze cíle, ze kterého byla odečtena pozice středu. Funkcí „Make Line“ byly poté označeny hranice jednotlivých buněk. Linie buněk musely být značeny s přesností 1 pixelu, jinak nebylo možné je následně identifikovat. Na základě těchto údajů se buňky segmentovaly s využitím funkce „Make Mask“, která umožnila vytvořit binární obrázek, kde byly bíle znázorněny hranice

buněk a černě veškeré okolí. Následně byly z černých ploch s bílým ohraničením vytvořeny objekty prostřednictvím funkce „Analyze Particles“, do kterých byly vloženy elipsy s definovaným středem. Na základě souřadnic objektů buněk, byly k jednotlivým buňkám přiřazeny cílie. Toho bylo dosaženo s využitím vytvoření přímky mimo objekt procházející bází cílie. Když tato přímka protнула hranici buněk lichým počtem protnutí, byla považována jako součásti buňky a když sudým počtem protnutí, byla mimo tuto buňku. Přiřazením těchto dat byla zkoumána vzdálenost cílií od středu buněk a jejich pozice v buňkách. Vzdálenost bází cílií buněk byla počítána vzorcem $d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$, kde x_1 a y_1 představují souřadnice středu a x_2 a y_2 souřadnice báze cílie. Vypočítané vzdálenosti byly vloženy do excelové tabulky a rozdíly v jednotlivých stádiích byly testovány pomocí lineárního smíšeného modelu. Pozice cílií byly měřeny pomocí přímky, která byla vedena od středu buňky k bázi cílie. Dále byl spočítán úhel této směrnice s osou obrázku a naměřené hodnoty byly převedeny do grafů.

4.10 Inhibiční experimenty

Embrya v roztoku E2 byla mechanicky zbavena gelovitého obalu a rozdělena do šesti jamkových misek. Do E2 byl v požadovaných koncentracích přimíchán inhibitor (SB505124; SCH28080; Omeprazol; Ciliobrevin) + DMSO a embrya byla ponechána vývoji při teplotě místnosti 18 °C. Zásobní roztoky inhibitorů byly v koncentracích 30 μM SB505124, 100 μM SCH28080, 20 mg/ml Omeprazol, 0,5 mg/ml Ciliobrevin. U experimentů prováděných na stádiích s přítomným levo-pravým organizátorem (st. 18–25) byla embrya po zániku organizátoru (st. 27–30) převedena do čistého E2. Ve stádiích 36–38 byl přerušen vývoj, embrya byla anestetizována pomocí MS-222 a fixována v 4% PFA přes noc, převedena vzestupnou methanolovou řadou do 100% methanolu a skladována při teplotě -20 °C.

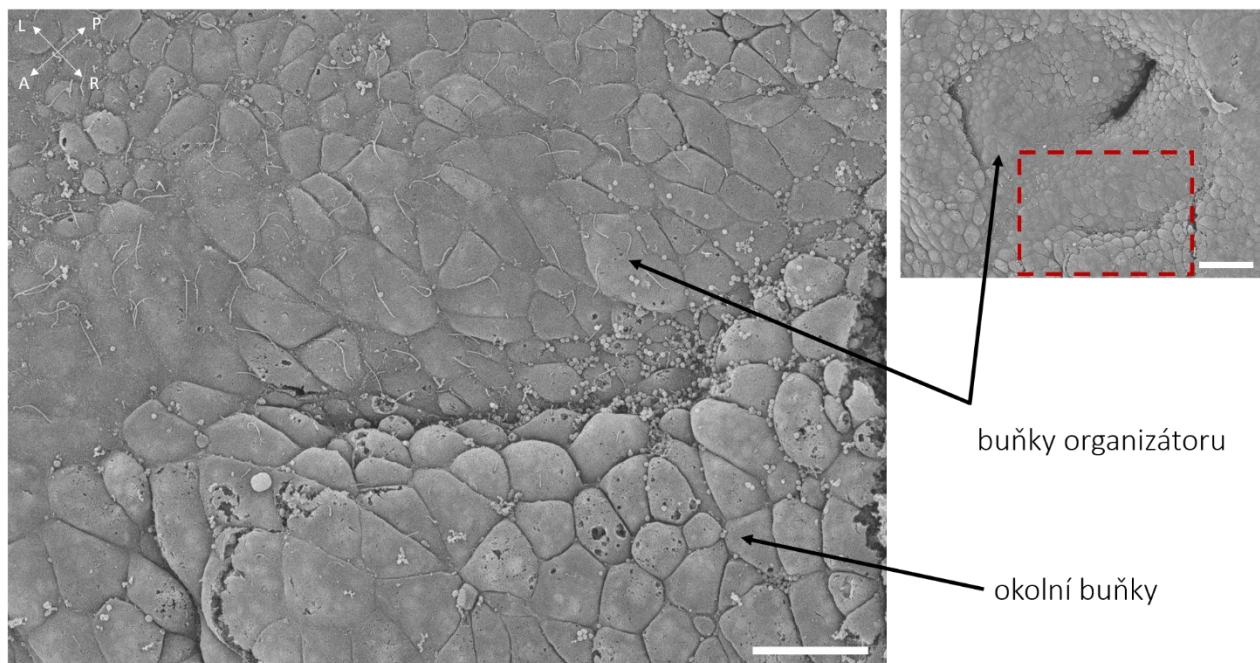
4.11 Focení a tvorba schémat

Whole mount embrya pro fotografie zaměřené na morfologickou analýzu určenou na základě stočení srdce a *in situ* hybridizaci ve stádiích 35–38 byla focena na stereolupě Olympus SZX 12 a imunofluorescenční fotografie byly pořízeny na mikroskopu Olympus BX 53 (oba z katedry zoologie, Přírodovědecké fakulty UK). Úpravu fotografií a tvorbu schémat jsem prováděla v programu Inkscape.

5 Výsledky

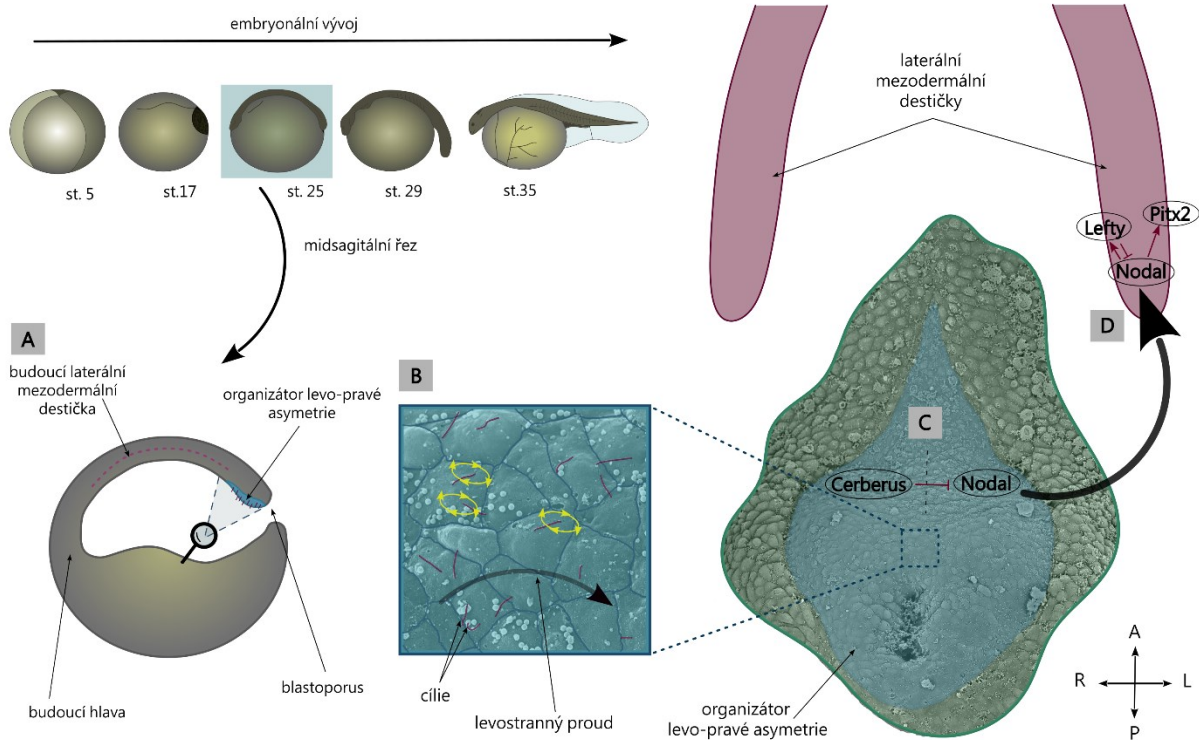
5.1 Organizátor levo-pravé asymetrie u jesetera malého

U valné většiny paprskoploutvých ryb, tedy těch, které spadají do skupiny Teleostei, byl jako organizátor levo-pravé asymetrie popsán Kupfferův váček. Tento organizátor však doposud nebyl podrobně zkoumán u ne-teleostních skupin ryb. Náš hlavní zájem se soustředil především na organizátor levo-pravé asymetrie jesetera malého (*Acipenser ruthenus*), ze skupiny chrupavčitých. Na základě existujících snímků jesetera bílého (*Acipenser transmontanus*) z 90. let jsme se primárně zaměřili na stádia 18–25 (Bolker, 1993). Během tohoto vývojového období se u jesetera v posteriorní oblasti zahrnující blastoporus nachází kapkovitá struktura. Buňky, které ji tvoří, se morfologicky odlišují od okolní tkáně, jsou více kompaktní, a především se u každé buňky nachází právě jedna cílie (obr. 5.1.). Tato struktura se (na rozdíl od Kupfferova váčku) velmi podobá organizátoru levo-pravé asymetrie u obojživelníků čili gastrocoelní střešní desce (Schweickert et al., 2007).



Obrázek 5.1 Porovnání buněk organizátoru s okolními buňkami. Napravo je vidět celý organizátor a nalevo zvětšená část organizátoru a okolních buněk. A = anterior, P = posterior, L= levá strana, R = pravá strana. Měřítka u levého obrázku představuje 20 μ m a u pravého obrázku 50 μ m.

Pro potvrzení, zda-li námi pozorovaná struktura plní opravdu funkci organizátoru levo-pravé asymetrie, jsme se zaměřili na její studii ve všech úrovní determinace levo-pravé asymetrie (podle schématu na obr. 5.2) čili především na funkci, pozici a délku cílů, roli Nodal signální dráhy v organizátoru, levé laterální mezodermální destičce a levostraných orgánech.



Obrázek 5.2 Schéma předpokládané determinace levo-pravé asymetrie těla u jesetera. Vlevo nahoře embrya jesetera ve stádiích 5, 17, 25, 29 a 35. A) Midsagitální řez neurulou. Lupa znázorňuje, jakým směrem se díváme na organizátor. B) Povrch organizátoru ukazuje epitel s přítomností monociliárních buněk. Jednotlivé cíle v organizátoru, následně svou rotací spouštějí levostranný proud. C) Na základě levostranného proudu dochází k diferenciální stranově-specifické přítomnosti interagujících proteinů Nodal a Cerberus. Nodal se nachází pouze na levé polovině organizátoru, protože na té pravé je inhibován proteinem Cerberus. D) Molekulární asymetrie ustavená na úrovni organizátoru je poté přenesena do levé laterální mezodermální destičky. Nodal aktivuje inhibitor Lefty a transkripční faktor Pitx2. Lefty zpětně inhibuje Nodal, čímž zabraňuje jeho rozšíření na pravou stranu. Pitx2 následně umožňuje vývoj levostraných nebo asymetrických orgánů.

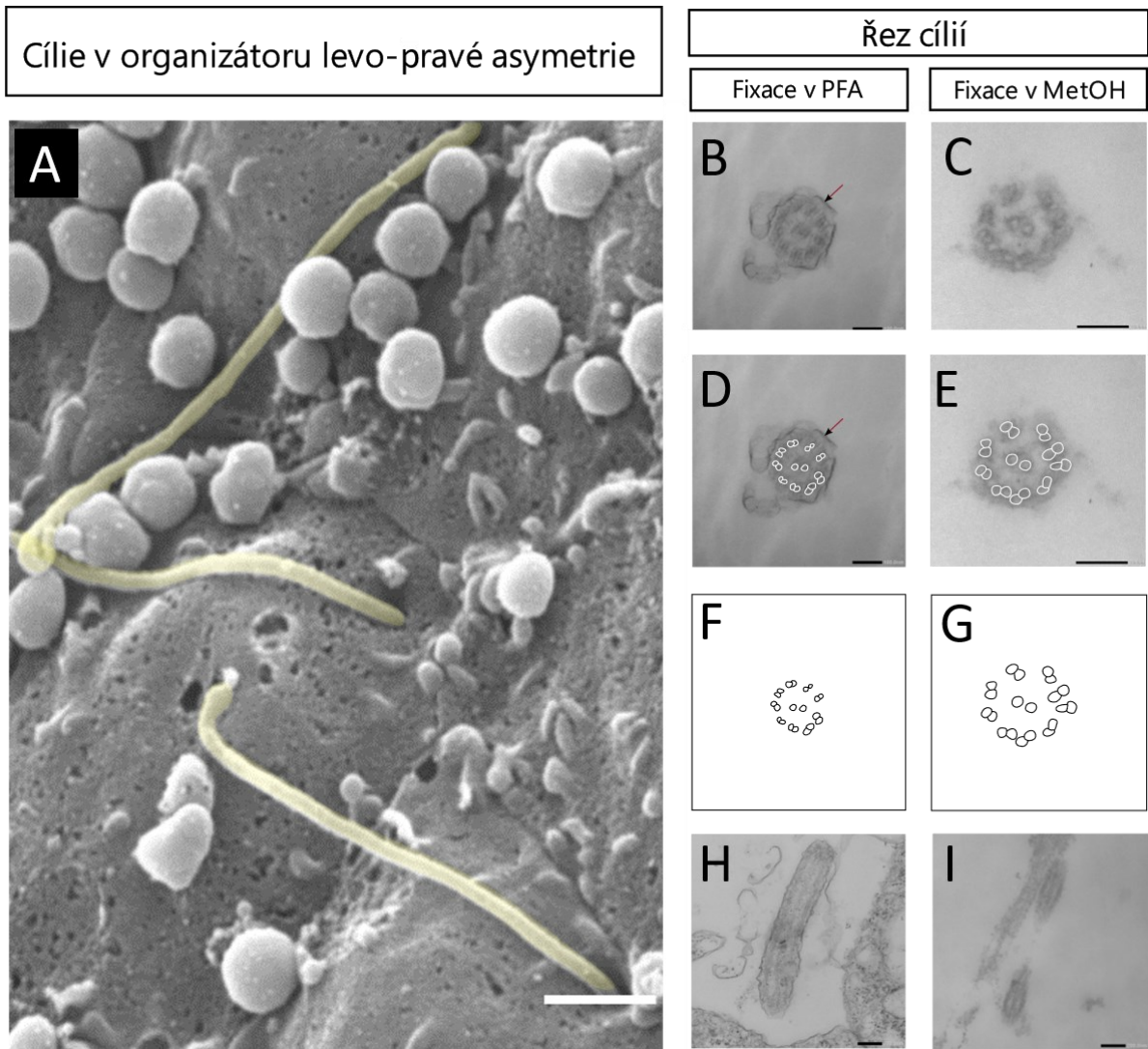
5.2 Cílie v organizátoru levo-pravé asymetrie jesetera

Pro správnou funkčnost organizátoru levo-pravé asymetrie je nepostradatelná přítomnost cílií. V našem případě byla prokázána především na embryích pozorovaných přes SEM (obr. 5.3 A). Jejich výskyt byl potvrzen během celé doby výskytu organizátoru, tedy stádiích 18 až 25 (obr. 5.6).

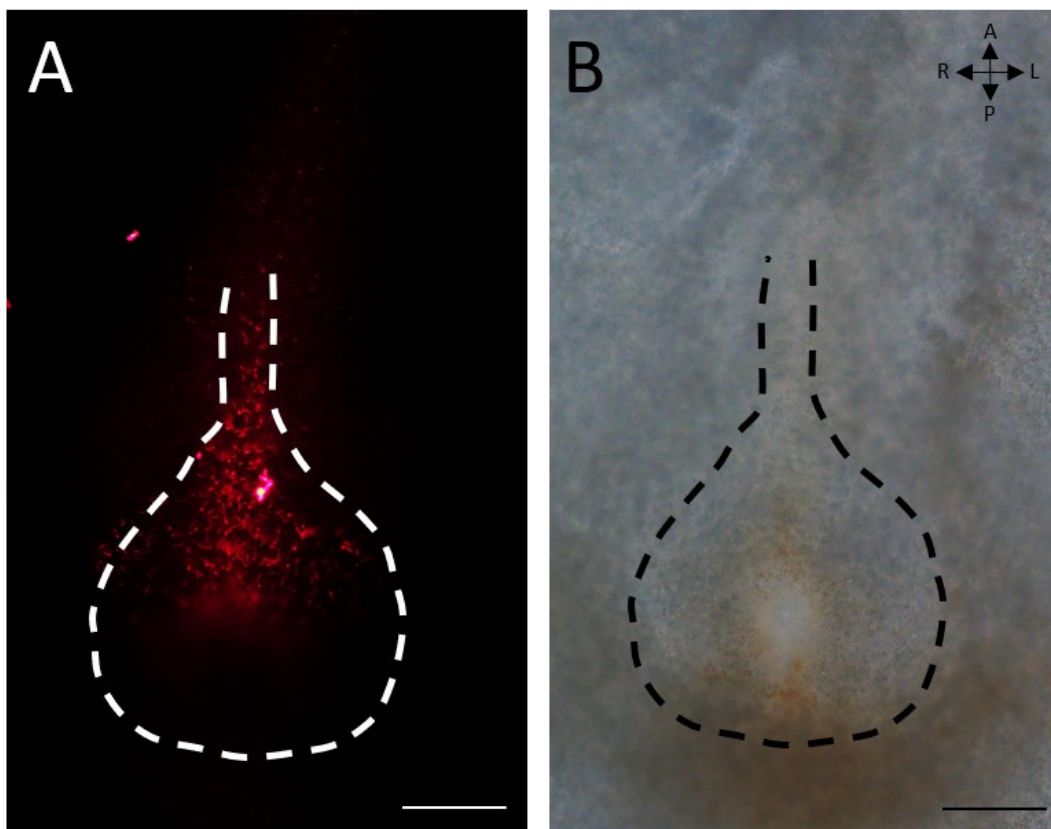
Přítomnost cílií jsme se pokoušeli sledovat i prostřednictvím fluorescenčního protilátkového barvení. Podařilo se nám potvrdit jejich výskyt pomocí signálu anti-ac. α -tubulinu (obr. 5.4), ale pro detekci hranic ciliárních buněk, která je nutná pro následnou analýzu pozice cílie v rámci buňky, nebyl signál protilátek při whole mount barvení dostatečně silný.

Vzhledem k tomu, že se u různých druhů živočichů vnitřní stavba cílií liší v počtu mikrotubulových doubletů (9+0, 9+2, 9+4), nás zajímala jejich konformace v organizátoru jesetera. Výsledky se nám podařilo získat pomocí TEM, kde na řezech cílií můžeme vidět vnitřní postavení mikrotubulových doubletů, které bylo pozorováno jako 9 + 2 (obr. 5.3 B-G). Zachovalejší morfologii cílií jsme získali u embryí, které byly trvale skladované v PFA, u kterých se povedlo zdokumentovat i část cytoplazmatické membrány. Snímky embryí fixovaných v methanolu mají zachované mikrotubuly v podobné kvalitě, jen u nich nikdy nebyla pozorována membrána.

Z pozorování tak předpokládáme, že při konformaci mikrotubulů 9 + 2, jsou cílie pravděpodobně pohyblivé a mají potenciál aktivovat levostranný proud v gastrocoelní střešní desce jesetera.

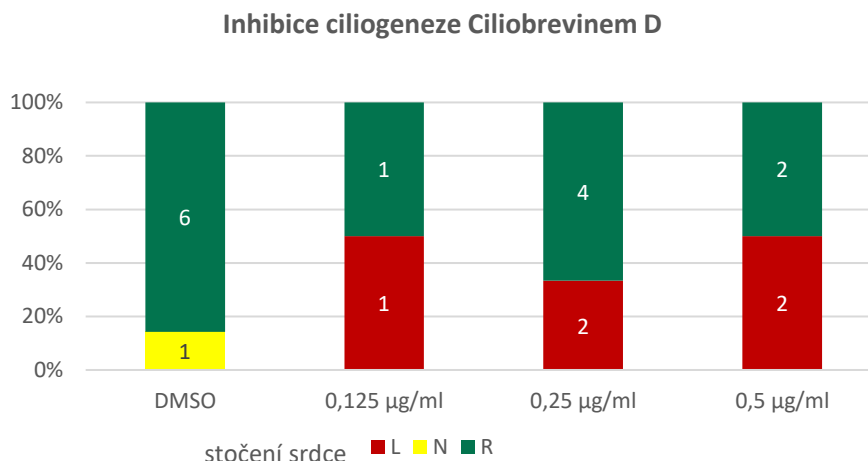


Obrázek 5.3 Struktura cílií v organizátoru levo-pravé asymetrie jesetera. A) Cílie v buňkách organizátoru focené metodou SEM. B-I) Ultrastruktura cílií focená pomocí TEM. Uspořádání mikrotubulových doubletů 9 + 2 je zvýrazněné na obrázcích D-G). Na snímcích fixovaných v PFA (B, D, H) lze vidět zbytek cytoplazmatické membrány (šipky u B a D). Na H-I se vyskytují cílie na částečně podélné řezu. Měřítko představuje u A – 1µm, B-G – 100nm, H-I – 200nm.



Obrázek 5.4 Protilátkové barvení cílií v organizátoru levo-pravé asymetrie jesetera. A) Cílie v organizátoru značené anti-ac. tubulinem (červeně). B) Organizátor focený na světelném mikroskopu. Měřítka značí 100 μ m.

Poté, co jsme potvrdili, že organizátor levo-pravé asymetrie jesetera je opravdu tvořen ciliárními buňkami, naším dalším krokem bylo ověření jejich funkce. Ve stádiích gastruly, kde se cílie teprve vyvíjejí, jsme do média přimíchali inhibitor ciliárního vývoje Ciliobrevin D (Tisler et al., 2016). Experiment jsme provedli celkem třikrát, ale bohužel díky velké citlivosti jeseteřích embryí až při posledním experimentu některá embrya přežila. Úmrtnost byla ale i při třetím pokusu velmi vysoká a vzhledem ke konci jeseteří reprodukční sezóny už experiment nemohl být zopakován. Výsledky posledního experimentu však naznačují, že při aplikaci inhibitoru cílií dochází ke vzniku následné randomizace stočení srdeční trubice, což by ukazovalo na nezbytnost přítomnosti cílií v gastrocoelní střešní desce pro správné ustavení levo-pravé asymetrie těla (obr. 5.5).

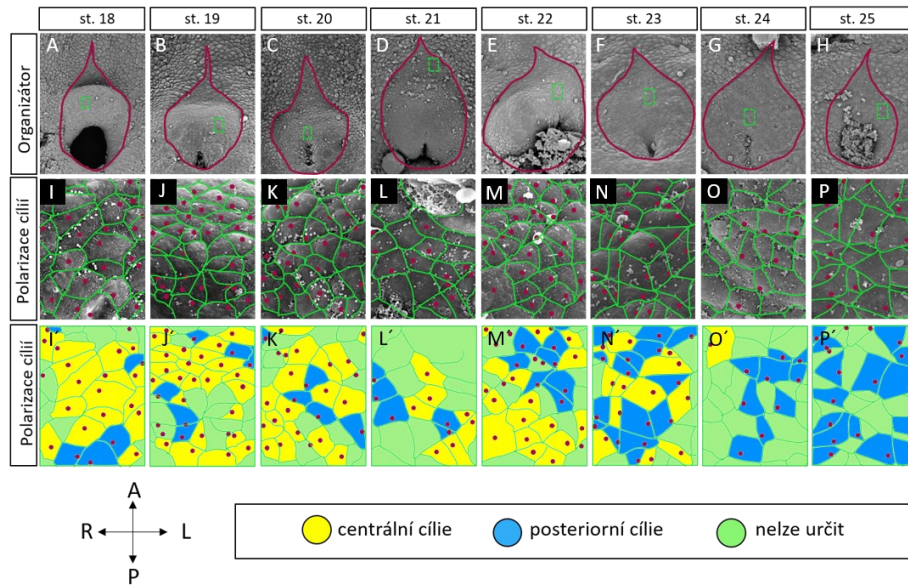


Obrázek 5.5 Inhibice ciliogeneze pomocí Ciliobrevinu D v titru koncentrací. Zeleně – embrya se stočeným srdcem na pravou stranu (wt), žlutě – embrya s nestočeným srdcem, červeně – embrya se stočeným srdcem na levou stranu. Sloupce značí různé koncentrace inhibitoru, čísla ve sloupcích ukazují počet embryí.

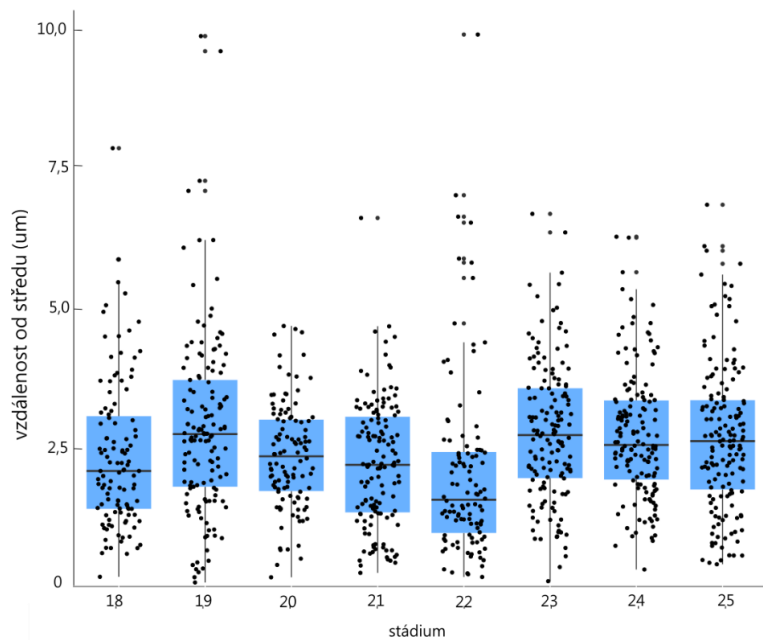
Běžně se u cílů levo-pravých organizátorů setkáváme s postupnou změnou jejich pozice v rámci buňky (Okada et al., 2005). Tuto problematiku jsme se rozhodli otestovat i u cílů v organizátoru jesetera. Na SEM snímcích organizátoru jsme nejprve interpretovali ciliární posun v rámci buňky u jednotlivých stádií (obr. 5.6). Naše pozorování naznačovalo změnu pozice cílů z centra buněk směrem k posterioru, a proto jsme se rozhodli provést podrobnější kvantitativní analýzu.

Jako první jsme měřili vzdálenost cílů od středu buněk s předpokladem, že se bude během vývoje zvyšovat. K našemu překvapení, se ale vzdálenost nikterak nelišila a nezaznamenali jsme žádné signifikantní rozdíly (obr. 5.7). Dále jsme tedy zvolili jiný přístup a analyzovali jsme úhel, který svírá cíle od středu buněk (obr. 5.8A). Pozorovali jsme, že během vývoje dochází k postupné posteriorizaci báze cílů (obr. 5.8B) tím, že dochází ke změně úhlu, který tato báze svírá se středem buňky. Na obr. 5.8C můžeme vidět, že první čtyři stádia (st. 18–21) mají poměrně vyvážené směry cílů do všech stran, kdežto starší stádia (st. 22–25) mají převahu cílů umístěnou na posteriorních stranách buněk. K těmto posunům nedochází ve skocích, ale postupně během celého vývoje organizátoru, kde se rozdíly mezi vývojově blízkými stádii zdají poměrně nepatrné obr. 5.8B.

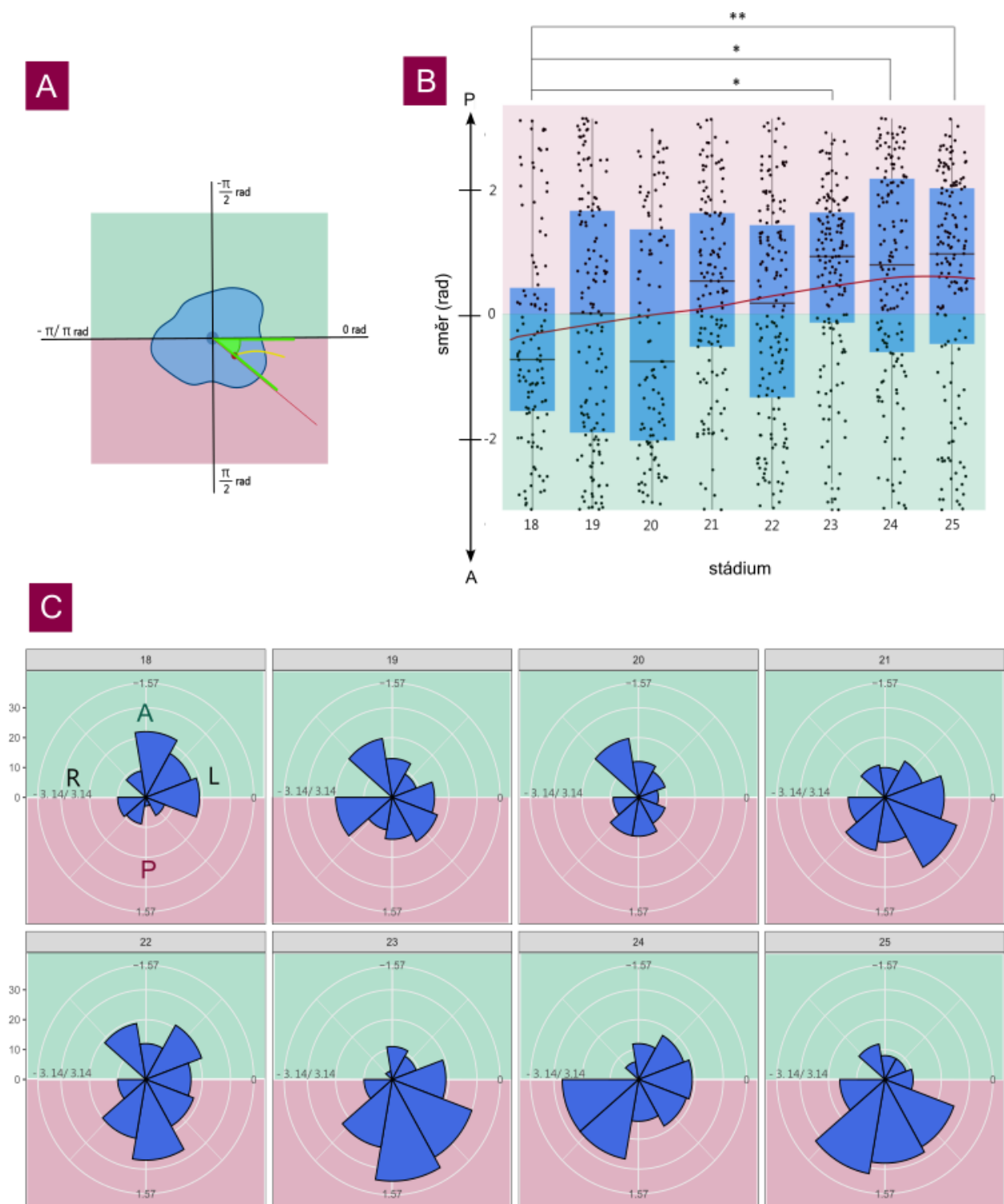
Analýza posteriorizace cílů tedy ukazuje, že i když se vzdálenost od středu mezi jednotlivými stádii neliší, cíle se postupně posouvají směrem k posterioru, přičemž lze usuzovat, že tento posun jim pomáhá generovat levostranný proud.



Obrázek 5.6 Změna pozice cílií v buňkách během vývoje organizátoru levo-pravé asymetrie jesetera. A-H znázorňuje organizátory jejichž obvod je červeně zvýrazněn. I-P ukazuje detail ciliárních buněk v organizátorech a I'-P' naznačuje interpretaci pozici cílií v těchto buňkách.



Obrázek 5.7 Analýza báze cílií od středu buněk během vývoje organizátoru levo-pravé asymetrie. Svislá osa ukazuje vzdálenost cílií od středu buněk v μm , vodorovná osa představuje jednotlivá stádia a body reprezentují jednotlivá měření každé cílie. p (st. 18/25) = 0,96188.

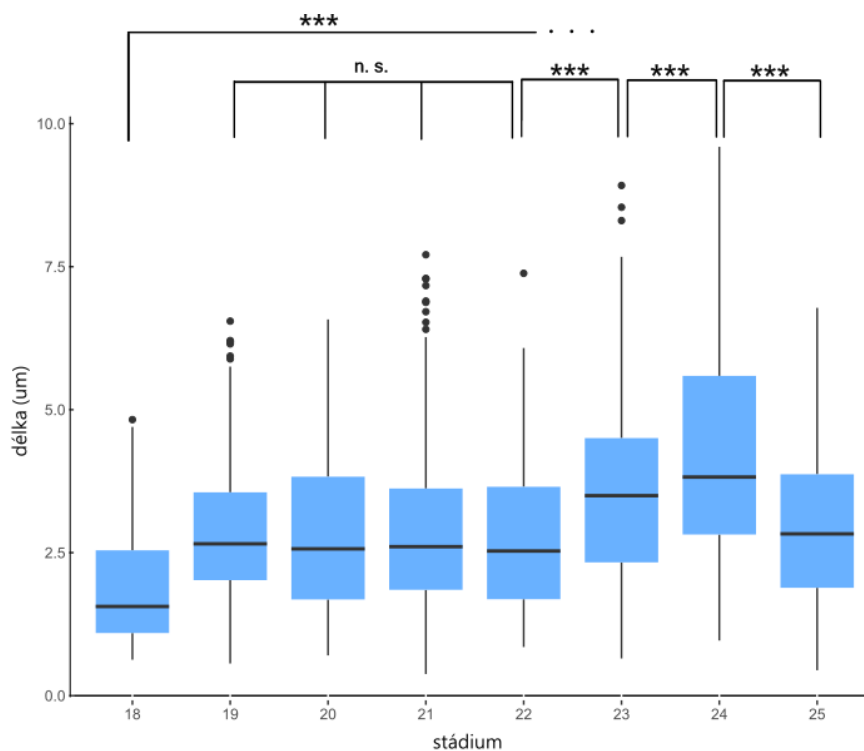


Obrázek 5.8 A) Nákres měření úhlu báze cílie od středu buňky. Modře buňka s modrým středem, žlutě cílie s červenou bází, zeleně je znázorněn úhel, který svírá báze cílie se středem buňky vzhledem k ose x definované jako levo-pravá osa. B) Graf úhlů, které během vývoje organizátoru svírá báze cílie se středem buňky v pohledu antero-posteriorní osy. Červeně je znázorněna spojnice trendu. Počítáno v radiánech. ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$. C) Grafické znázornění úhlů mezi bázemi a středem buňky pomocí kruhových výsečí. Jednotlivé výseče ukazují četnost cílií v určitém úhlu. Růžově je znázorněn posteriorní a zeleně anteriorní směr. 0 rad = 0°; -1,57/ 1,57 rad = -90°/ 90°; -3,14/ 3,14 rad = -180°/ 180°.

Během vývoje organizátoru levo-pravé asymetrie drápatky postupně dochází k prodlužování délky cílů v organizátoru (Schweickert et al., 2007). My jsme testovali, zda tento trend platí i pro organizátor levo-pravé asymetrie jesetera prostřednictvím měření délky cílů ve stádiích 18–25.

S využitím lineárního smíšeného modelu při srovnání stádia 18 s jakýmkoliv následujícím stádiem je rozdíl v jejich délce signifikantní. Nejkratší délky byly naměřeny ve stádiu 18, kde průměr délky cílů dosahoval přibližně 1,5 μm , a naopak nejdelší cíle ve stádiu 24 byly dlouhé přibližně 2,75 μm . Výsledky ukazují dvě velké změny během vývoje organizátoru, a to v přechodu mezi stádii 18–19 a stádii 22–24. Naopak ve stádiu 25 jsou cíle opět kratší vzhledem k předchozímu stádiu, což si vysvětlujeme jako začátek jejich degradace.

Tato analýza tak ukazuje, že i v gastrocoelní střešní desce jesetera dochází během jejího vývoje k prodlužování délky cílů, což podporuje hypotézu o funkční pohyblivosti cílů v tomto organizátoru.

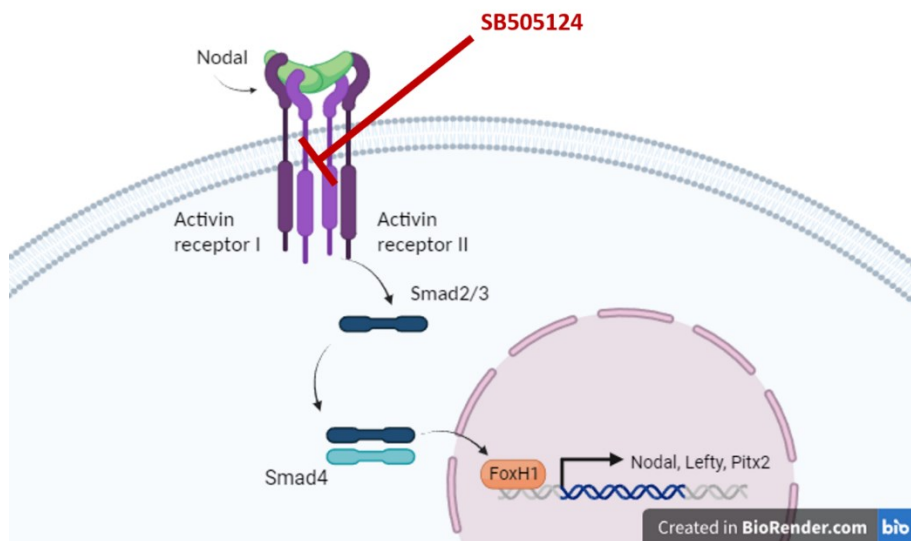


Obrázek 5.9 Analýza délky cílů během vývoje organizátoru levo pravé asymetrie jesetera. Svislá osa značí délku cílů v μm , horizontální osa ukazuje jednotlivá vývojová stádia. *** = $p < 0,001$.

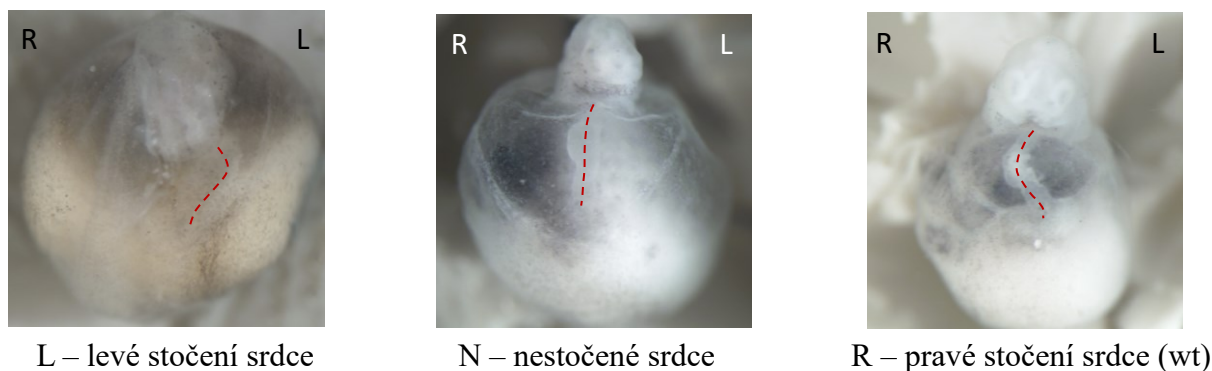
5.3 Přítomnost Nodal signální dráhy

Levostranný proud generovaný pohyblivými cíliemi v organizátorech levo-pravé asymetrie následně vede k asymetrické aktivaci Nodal signální dráhy (Blum et al., 2014). Pro ověření aktivní účasti této dráhy v determinaci levo-pravé asymetrie u jesetera jsme provedli farmakologickou inhibici prostřednictvím inhibitoru SB505124 (inhibitor Aktivinových receptorů I viz obr. 5.10). Experimenty byly prováděny během dvou reprodukčních sezón. Nejprve jsme ověřovali funkci Nodal dráhy v organizátoru levo-pravé asymetrie (st. 18–25) aplikací různých koncentrací SB505124 (obr. 5.12) pouze po dobu námi předpokládané funkce organizátoru. Embrya jsme poté nechali vyvinout do stádia 36–38 a sledovali jsme stočení jejich srdeční trubice, přičemž normální stočení je na pravou stranu (obr. 5.11). Nejvyšší koncentrace, ve které jeseteří embrya dokázala přežít, byla 10 μM SB505124. V nižších koncentracích tohoto inhibitoru jsme u embryí pozorovali častější stočení srdce na levou stranu v porovnání s vyššími koncentracemi, kde většina ošetřených embryí srdeční trubici neměla stočenou (obr. 5.12). Tento experiment ukázal, že při různých koncentracích inhibitoru dochází k odlišným odchylkám od wildtype fenotypu, což by mohlo ukazovat na zastoupení další dráhy v levo-pravém organizátoru.

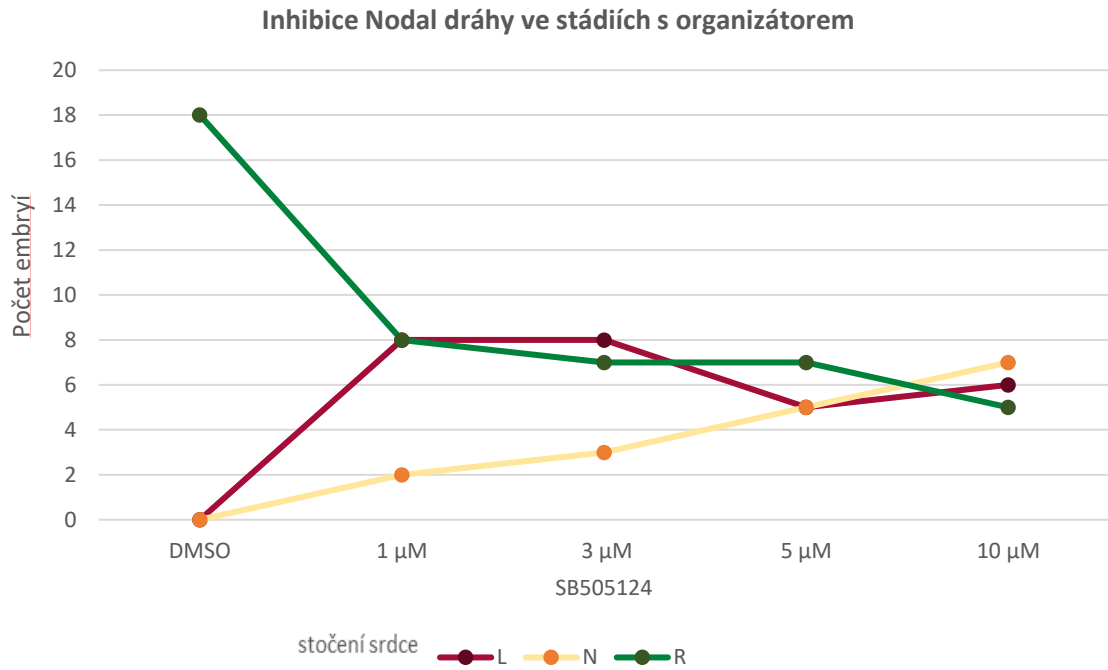
Následně jsme zopakovali inhibici s 10 μM SB505124. Experiment byl proveden třikrát a v jednotlivých opakováních se lišil v počtu přeživších jeseterů, které přikládáme rozdílné kvalitě jednotlivých oplození. U všech těchto experimentů většina inhibovaných embryí vykazovala stejný trend, a to žádné stočení srdeční trubice (obr. 5.13), což poukazuje na nezbytnou funkci Nodal dráhy u jeseterů ve stádiích s přítomným organizátorem levo-pravé asymetrie.



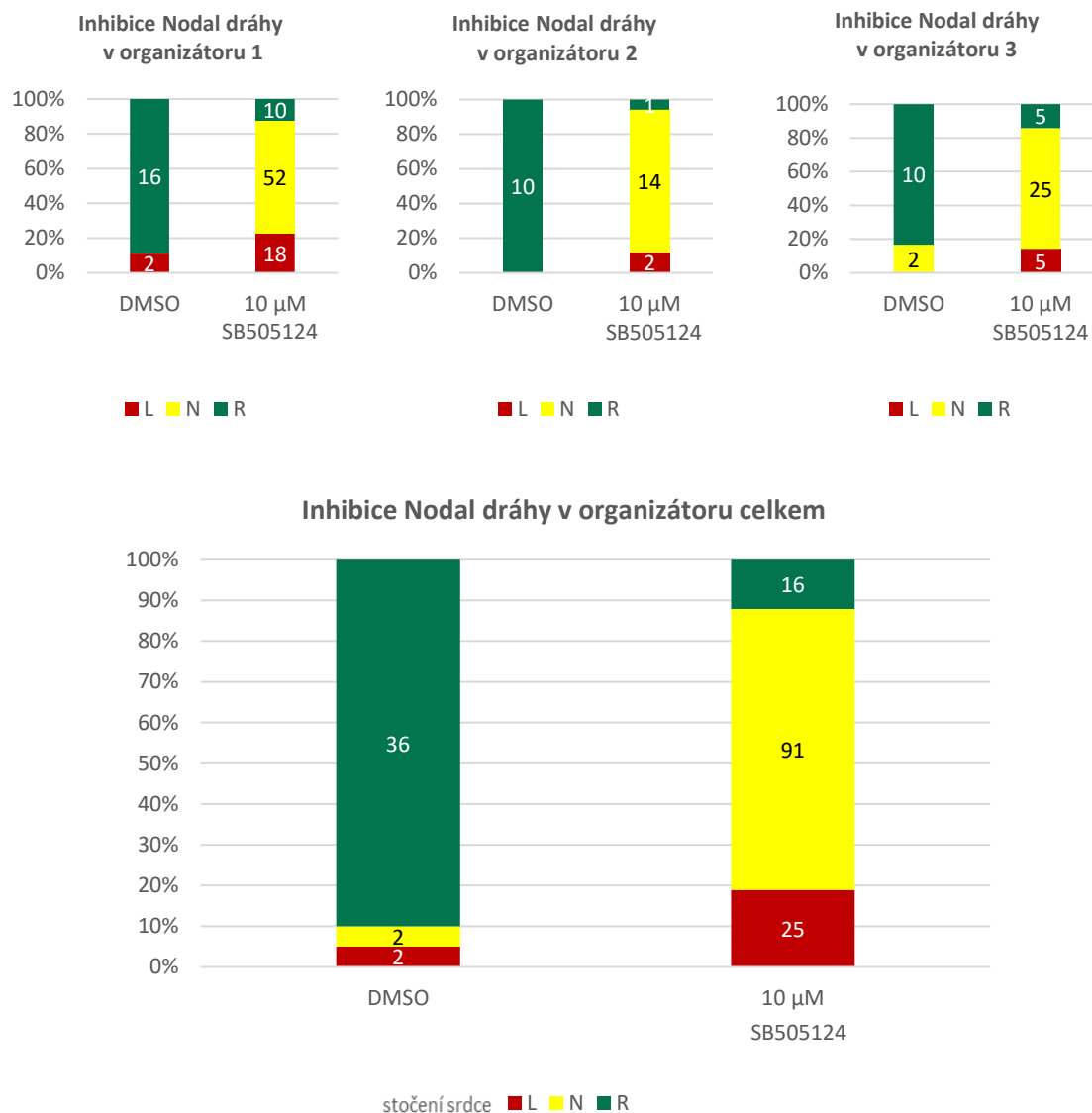
Obrázek 5.10 Interakce proteinu Nodal s buňkou. Nodal jako člen nadrodiny TGF β nasedá na serin-threoninové kinázy, což jsou v tomto případě Aktivinové receptory I a II. Tyto receptory fosforylují proteiny Smad2/3, které dimerizují se Smad4. Smad komplex následně vstupuje do jádra, kde aktivuje transkripční faktor FoxH1, který spouští transkripci *Nodal*, *Lefty* a *Pitx2*. Farmakologický inhibitor SB505124, inhibuje Aktivinové receptory I, čímž zastavuje celou Nodal dráhu. Toto schéma bylo vytvořeno v BioRender.com.



Obrázek 5.11 Fenotypy embryí jesetera po farmakologické inhibici inhibitorem SB505124.

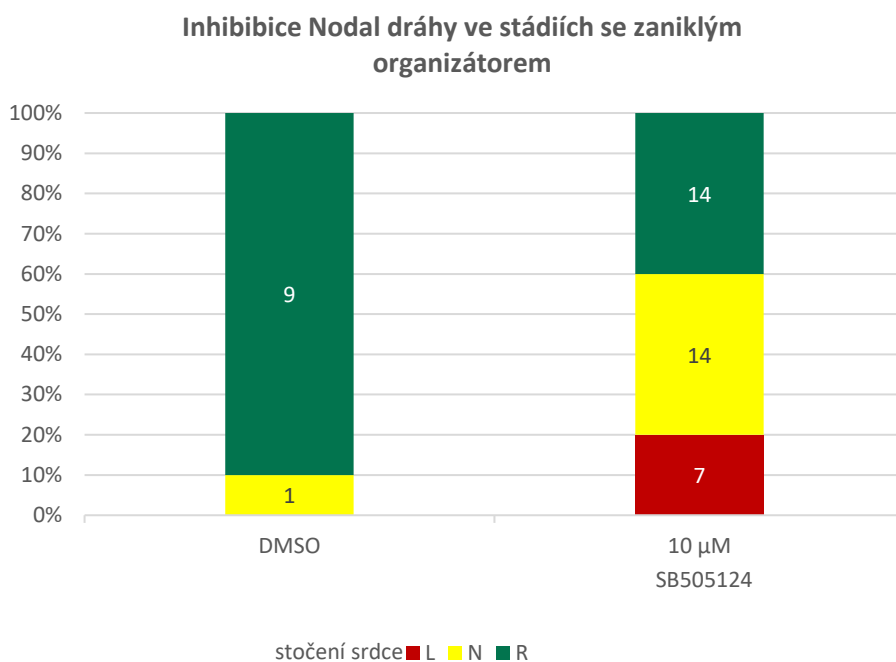


Obrázek 5.12 Farmakologická inhibice Nodal signální dráhy v titru koncentrací SB505124. Hodnoty znázorňují počet embryí inhibovaných ve stádiích organizátoru (18–25). L = levé stočení srdce, N = nestočené srdce, R = pravé stočení srdce (wt).



Obrázek 5.13 Farmakologická inhibice Nodal dráhy ve stádiích s organizátorem levo-pravé asymetrie jesetera pomocí 10μM SB505124. Horní grafy reprezentují tři nezávislé experimenty a spodní graf ukazuje všechny tyto výsledky dohromady. L = levé stočení srdce, N = nestočené srdce, R = pravé stočení srdce (wt).

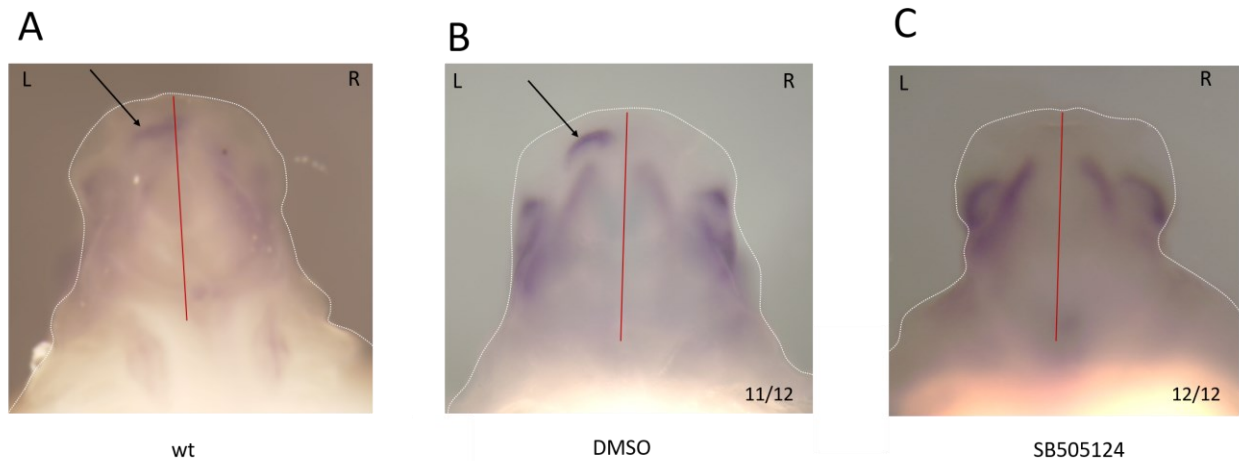
Kromě funkce Nodal signální dráhy v organizátoru levo-pravé asymetrie jsme také testovali její funkci ve stádiích, kde předpokládáme výskyt Nodal dráhy v levé laterální mezodermální destičce. Použili jsme stejný farmakologický inhibitor SB505124, ale tentokrát na embrya s již zanikajícím organizátorem levo-pravé asymetrie (od st. 27). I když výsledky nejsou natolik jednoznačné jako u inhibice ve stádiích s organizátorem, pozorovali jsme u embryí randomizaci stočení srdeční trubice (obr. 5.14).



Obrázek 5.14 Farmakologická inhibice Nodal dráhy ve stádiích s již zanikajícím organizátorem. Inhibice byla provedena pomocí 10μM SB505124 od vývojového stádia od 27 do 37. L = levé stočení srdce, N = nestočené srdce, R = pravé stočení srdce (wt).

Kromě role Nodal signální dráhy v determinaci levo-pravé asymetrie vnitřních orgánů břišní a hrudní dutiny, hraje tato dráha roli v levo-pravě asymetrické morfogenezi středního mozku (Lanoizelet et al., 2023). *In situ* hybridizace ukázala přítomnost *Pitx2* transkriptů v levé části středního mozku jeseterů ve stádiu 37 (obr 5.15). U všech jedinců inhibovaných ve stádiích s organizátorem s 10μM SB505124 tato exprese nebyla přítomna, a to nezávisle na jejich stočení srdeční trubice. *In situ* hybridizací pro *Nodal* a *Lefty* jsme zaznamenali žádný signál ani u kontrolních wildtype embryí, z čehož usuzuji nefunkčnost těchto prob. Plánujeme však na jejich vývoji pracovat dále a transkripci *Nodal* a *Lefty* ověřit při dalších studiích.

Výsledky nicméně naznačují, že Nodal signální dráha je nezbytná jak při levo-pravé asymetrii srdce, tak i středního mozku, přičemž je řízena v obou těchto orgánech individuálně.



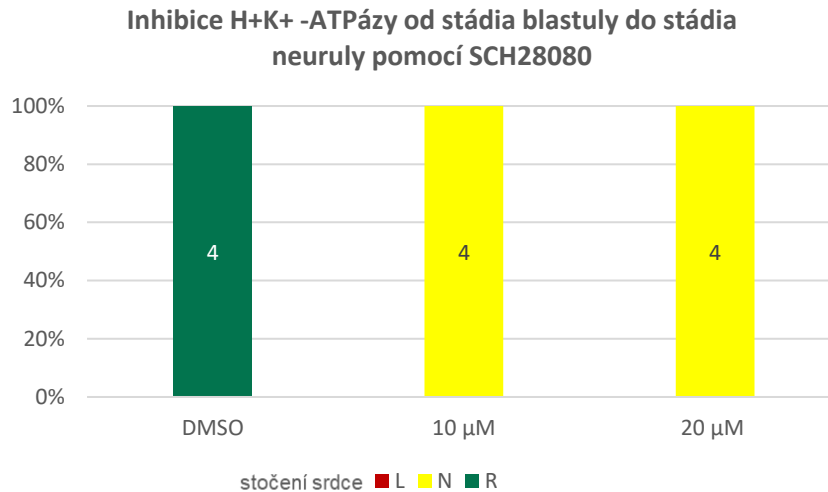
Obrázek 5.15 Exprese *Pitx2* ve středním mozku jesetera. A) wildtype, B) DMSO kontrola, C) po inhibici pomocí SB505124. U 11 z 12 embryí s DMSO byla pozorována exprese *Pitx2* v levé části středního mozku, stejně jako u wildtypu (viz šipka). Zatímco u embryí inhibovaných 10 μ M SB505124 nebyla tato exprese přítomna u 12 z 12 jedinců.

5.4 Vliv H+K+-ATPázy na levo-pravou asymetrii jesetera

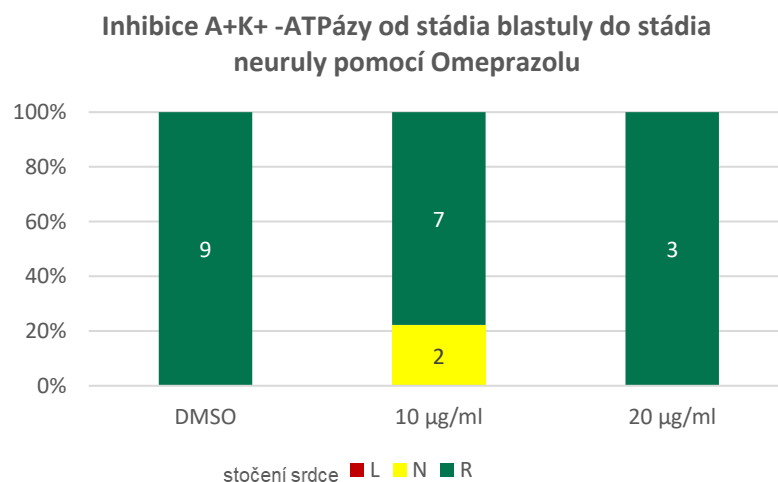
Předchozí studie na drápatce ukázaly, že pro správnou determinaci levo-pravé asymetrie těla, je kromě Nodal signální dráhy, důležitá také přítomnost protonových pump. Tyto studie se zaměřovaly především na velmi časný embryonální vývoj, kde autoři pozorovali levo-pravou asymetrii již ve stádiu dvou buněk (Adams et al., 2006; Levin et al., 2002).

Nás zajímalo, jestli je přítomnost těchto pump důležitá pouze v časném vývoji nebo také přímo v organizátoru levo-pravé asymetrie. Konkrétně jsme se zaměřili na úlohu H+K+-ATPázy, a to pomocí její farmakologické inhibice prostřednictvím dvou inhibitorů – SCH28080 a Omeprazol.

Pro inhibici H+K+ ATPázy ještě před vznikem organizátoru, jsme ošetřili embrya ve stádiích blastuly (st.10–12) a ponechali je v médiu s inhibitorem až do začátku neurulace (st.18–20). U všech embryí jsme následně pozorovali stočení srdce. Při inhibici SCH28080 docházelo k velké mortalitě embryí, ale u přeživších jedinců jsme pozorovali nestočené srdeční trubice (obr. 5.16). Naproti tomu u druhého inhibitoru – Omeprazolu, jsme při využití dvou různých koncentrací nepozorovali žádné rozdíly v tomto fenotypu (obr. 5.17).



Obrázek 5.16 Farmakologická inhibice H+K+-ATPázy na stádiích blastuly (10–12) až neuruly (do 25) pomocí inhibitoru SCH28080. L = levé stočení srdce, N = nestočené srdce, R = pravé stočení srdce (wt).

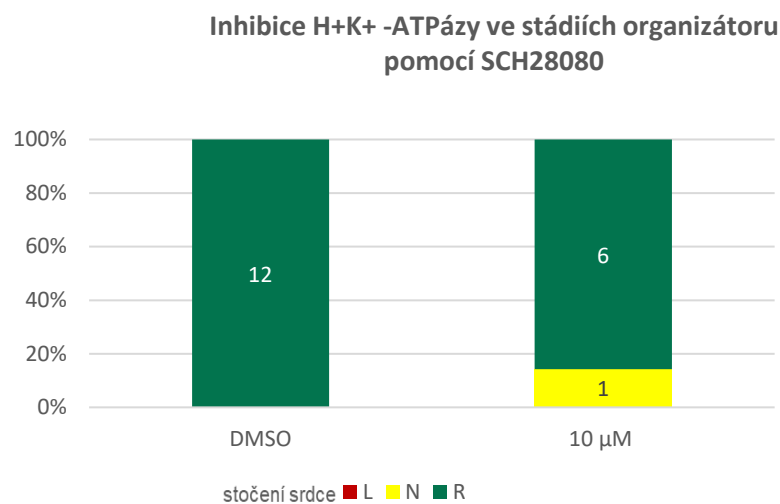


Obrázek 5.17 Farmakologická inhibice H+K+-ATPázy ve stádiích blastuly (10–12) až neuruly (do 25) pomocí Omeprazolu. L = levé stočení srdce, N = nestočené srdce, R = pravé stočení srdce (wt).

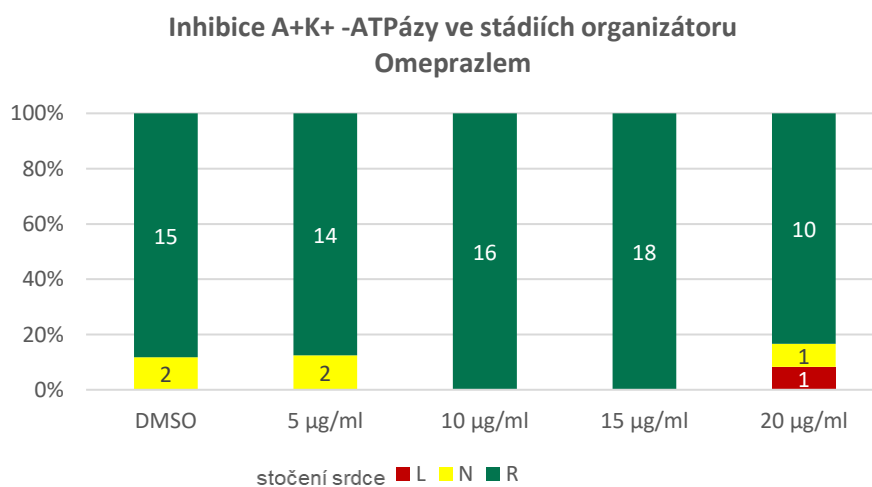
U inhibice pomocí SCH28080 ve stádiích organizátoru levo-pravé asymetrie (st. 18–25) jsme použili tři rozdílné koncentrace a u téměř všech experimentů zahynula veškerá inhibovaná embrya do stádia 32, čili příliš brzy na určení stočení srdeční trubice. Při posledním experimentu přežila nepatrná část v 10µM SCH28080 (obr. 5.18). Výsledky použití tohoto inhibitoru tak neukazují žádné signifikantní rozdíly fenotypu při inhibici H+K+ -ATPázy v organizátoru levo-pravé asymetrie jesetera.

Co se týče inhibice H⁺K⁺-ATPázy v organizátoru (st. 18–25) Omeprazolem, embrya nevykazovala natolik vysokou úmrtnost, ale inhibice v daných koncentracích neprokázala žádný efekt na fenotyp embryí (obr. 5.19).

Experimenty s inhibicí H⁺K⁺-ATPázy tedy naznačují, že tyto protonové pumpy jsou pro levo-pravou asymetrii jeseterů nezbytné především do doby vzniku gastrocoelní střešní desky a pravděpodobně nehrají takovou roli ve stádiích s již přítomným organizátorem.



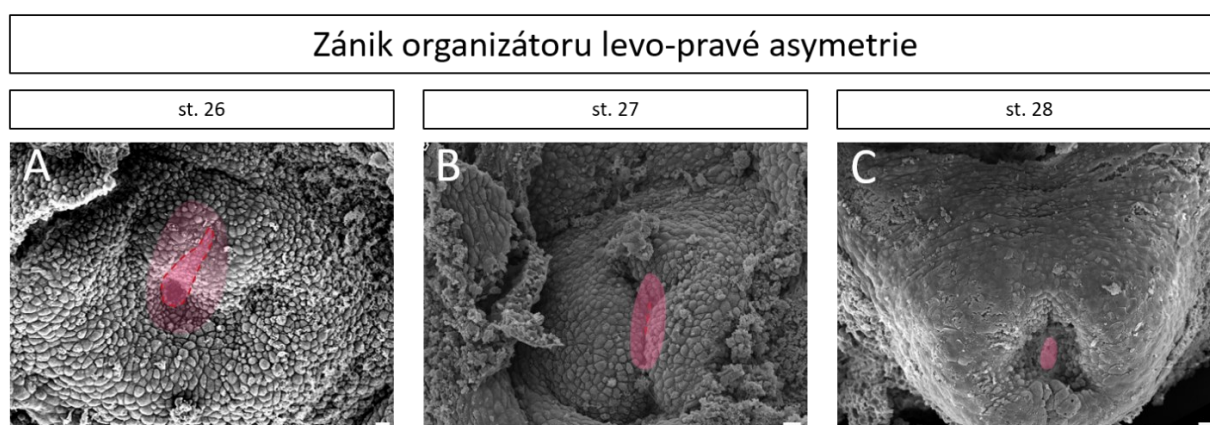
Obrázek 5.18 Farmakologická inhibice H⁺K⁺-ATPázy ve stádiích organizátoru levo-pravé asymetrie pomocí inhibitoru SCH28080. L = levé stočení srdce, N = nestočené srdce, R = pravé stočení srdce (wt).



Obrázek 5.19 Farmakologická inhibice H⁺K⁺-ATPázy ve stádiích organizátoru levo-pravé asymetrie pomocí Omeprazolu. L = levé stočení srdce, N = nestočené srdce, R = pravé stočení srdce (wt).

5.5 Zánik organizátoru levo-pravé asymetrie jesetera

Poté, co organizátory levo-pravé asymetrie spustí aktivitu Nodal signální dráhy, běžně dochází k jejich zániku (Ikeda et al., 2022). Pro potvrzení, zda k obdobnému zániku dochází i u jesetera jsme sledovali i starší stádia, než je 25. Ve stádiu 26 jsme pozorovali, že se struktura organizátoru zmenšuje a buňky pravděpodobně postupně involují dovnitř embrya až do stádia 28 (obr. 5.20). Ve stádiu 29 se u jeseteřích embryí vyskytuje pouze pupen ocasu bez přítomnosti organizátoru levo-pravé asymetrie.



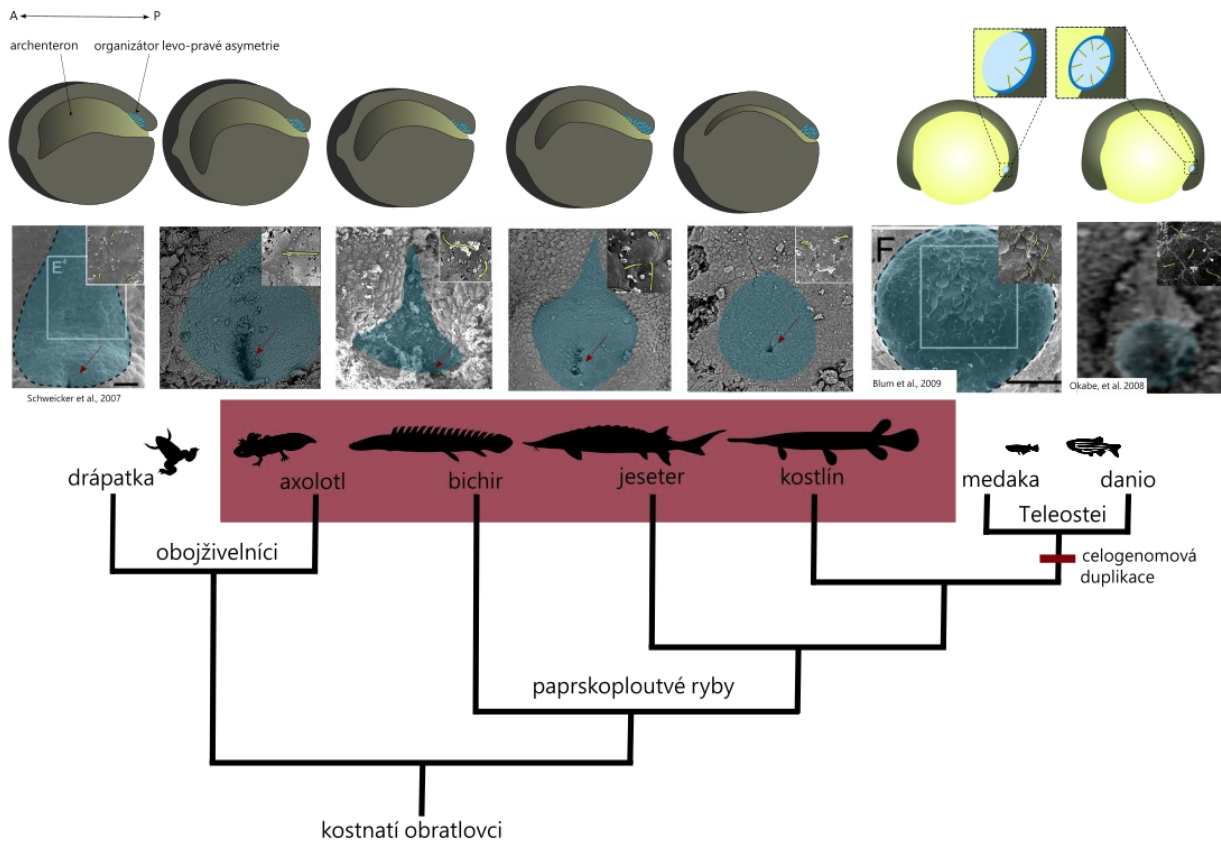
Obrázek 5.20 Zánik organizátoru levo-pravé asymetrie jesetera. A-C stádia 26–28 s involujícím buňkami organizátoru (růžově). Měřítka značí 20 μ m.

5.6 Organizátor levo-pravé asymetrie paprskoploutvých ryb

I když jsme se v této práci soustředili především na organizátor levo-pravé asymetrie jesetera, pro doplnění evolučního kontextu jsme stejným způsobem (s využitím SEM) hledali organizátory levo-pravé asymetrie u ostatních ne-teleostních paprskoploutvých ryb. Konkrétně se jednalo o bichira a kostlína, a pak také u axolotla, coby zástupce ocasatých obojživelníků. Jejich organizátory se nacházely ve stejném vývojovém období jako u jesetera, čili v období neurulace. U všech výše zmíněných druhů byl nalezen organizátor jako kapkovitá struktura obklopující blastoporus (obr. 5.21), která je velmi odlišná od organizátoru levo-pravé asymetrie u teleostů a odpovídá organizátoru drápatky.

Tato pozorování ukazují, že gastrocoelní střešní deska, známá jako organizátor levo-pravé asymetrie drápatky se vyskytuje i u ne-teleostních paprskoploutvých ryb, které se

tak velmi odlišují od skupiny Teleostei, kde funkci levo-právého organizátoru přebírá Kupfferův váček.



Obrázek 5.21 Evoluce organizátoru levo-pravé asymetrie. Nejvýše – nákresy vývojových stádií s organizátory. Modře označené jsou organizátory, v pravém horním rohu SEM snímků jsou přiblíženy buňky s cíliemi značnými žlutě, červené šipky ukazují na oblast blastoporu. Pod snímky jsou uvedeny jednotlivé druhy a jejich fylogenetická příbuznost. Růžový obdélník zvýrazňuje druhy, u kterých jsem pořídila vlastní SEM snímky. Gastrocoelní střešní deska drápatky (Schweickert et al., 2007), Kupfferův váček medaky (Blum et al., 2009b), Kupfferův váček dania (Okabe et al., 2008).

6 Diskuze

6.1 Gastrocoelní střešní deska jako organizátor levo-pravé asymetrie jesetera

Organizátory levo-pravé asymetrie byly popsány především na zástupcích modelových druhů obratlovců, detailně hlavně u drápatky, myši a dánia. Jestli se s obdobnými strukturami setkáváme i u nemodelových zástupců, není dobře známo. U paprskoploutvých ryb byl organizátor levo-pravé asymetrie podrobně zkoumán na teleostních rybách jako je dánio a medaka. Byl zde popsán jako dutá kulovitá struktura tvořená ciliárními buňkami, která je nazývána jako Kupfferův váček (Kreiling et al., 2007).

Zajímavé je, že organizátor levo-pravé asymetrie paprskoploutvých ryb dosud nebyl podrobněji zkoumán na zástupcích nepatřících do skupiny Teleostei. Tato práce se zaměřuje na studium tohoto organizátoru u druhu ne-teleostních paprskoploutvých ryb – jesetera malého (*Acipenser ruthenus*). Právě u neuruly jesetera (konkrétně jesetera bílého) byla v 90. letech pozorována struktura neodpovídající organizátoru levo-pravé asymetrie většiny ryb, tedy Kupfferovu váčku (Bolker, 1993). Od té doby se touto strukturou nikdo nezabýval a role pozorované struktury jako organizátoru nebyla tudíž prokázána.

V této práci jsme ve stádiích 18–25 u jeseterů zbavených žloutku sledovali posteriorní část embrya kolem oblasti blastoporu. Pomocí snímků z SEM se nám podařilo identifikovat strukturu umístěnou ve styku s archenteronem, která připomíná tvar kapky a obklopuje blastoporus (obr. 5.1). Tato kapkovitá struktura se nápadně podobá gastrocoelní střešní desce (GRP) popsané u drápatky, která zde zastupuje právě úlohu organizátoru levo-pravé asymetrie (Schweickert et al., 2007).

Drápatka a jeseter mají velmi podobný časný embryonální vývoj. Jako hlavní gastrulační pohyb využívají involuci, díky které se buňky superficiálního mezodermu dostávají skrz blastoporus dovnitř embrya, kde dávají vzniku organizátoru levo-pravé asymetrie (Shook et al., 2004). Gastrocoelní střešní deska se tak u nich vyskytuje ve stejné vývojové fázi, tedy neurulaci. Zaměříme-li se na rozdíly v morfologii tohoto organizátoru u drápatky a jesetera, příliš mnoho jich nenajdeme. Jako hlavní rozdíl bych uvedla, že u GRP drápatky se struktura u většiny jedinců nachází anteriorně od blastoporu, tedy blastoporus není jeho přímou součástí (Blum et al., 2009a). Naproti tomu u jesetera jsme u každého embrya pozorovali strukturu zahrnující celý blastoporus (obr. 5.6).

Buňky organizátoru se liší od okolní tkáně svojí kompaktností, kdy lze i pouhým okem pozorovat hranice mezi organizátorem a okolní tkání. Tyto buňky se zdají být silně propojeny, hranice mezi některými buňkami organizátoru bylo na SEM snímcích někdy těžké identifikovat. Co se týče organizátoru u jednotlivých stádií jesetera, nepozorovali jsme žádné zásadní změny v jeho tvaru a velikosti během jeho funkčního období. Některé GRP byly více či méně vmáčknuté dovnitř embrya nebo naopak vypoulené. Tyto rozdíly se však ukázaly být nezávislé na stupni vývoje. Rozdíly mohou být dány diverzitou mezi jednotlivými jedinci, nebo samozřejmě nelze vyloučit jejich změnu během fixace či jiné manipulace.

Z těchto pozorování tedy vyplývá, že ve stádiu neuruly se u jeseterů nachází struktura podobná gastrocoelní střešní desce drápatky, která by potenciálně měla splňovat stejné funkce jako organizátory levo-pravé asymetrie ostatních obratlovců (obr. 5.1).

6.2 Cílie v gastrocoelní střešní desce jesetera

Cílie tvoří nepostradatelnou roli v buňkách organizátoru levo-pravé asymetrie téměř u všech obratlovců. Jedinou výjimkou je Hensenův uzel ptáků (Cooke, 1995), kde cílie nebyly doposud nalezeny. U zbylých skupin cílie zajišťují stejným mechanismem determinaci levo-pravé asymetrie těla. Svou rotací umožňují vznik levostranného proudu extracelulární tekutiny, která následně spouští asymetrickou genovou expresi (Essner et al., 2002).

Při přiblížení jednotlivých buněk organizátoru jesetera jsme pozorovali cílie, které se zde vyskytovaly ve všech námi studovaných stádiích organizátoru. Z většiny buněk vystupovala pouze jedna cílie, a to v celé GRP. Po pozorování desítek těchto organizátorů jesetera, se domnívám, že nejdelší cílie se nacházejí v organizátoru více anteriorně. Ze získaných dat ale nelze tuto hypotézu jednoznačně potvrdit. Nicméně velmi zajímavé by bylo to otestovat v budoucích studiích, kde by se kladl důraz na délku cílím v určitých oblastech v rámci jednoho organizátoru.

Přítomnost cílím v gastrocoelní střešní desce jesetera se nám podařilo potvrdit i pomocí protilátkového barvení anti-ac. tubulinem, kde jsou znázorněny cílie v anteriorní oblasti od blastoporu (obr. 5.4). Barvení cytoplazmatických membrán bohužel na whole-mount vzorcích nedosahovalo dostatečného signálu, který bychom mohli dokumentovat. Nelze tak tímto způsobem hodnotit monociliaritu či postavení cílím v buňkách. V budoucnu by jistě bylo

vhodné, pokusit se o fluorescenční znázornění cílů a buněk na řezech organizátorem, kde by se dal očekávat lepší signál na úrovni hranic jednotlivých buněk.

Základní strukturu každé cíle tvoří mikrotubulové doublety. Jejich uspořádání se u jednotlivých organizátorů levo-pravé asymetrie liší, a to nejen v rámci morfologicky odlišných organizátorů. Dokonalým příkladem je konformace mikrotubulových doubletů u cílů v Kupfferově váčku medaky a dánia. Cíle u medaky jsou tvořeny 9 + 0 mikrotubulových doubletů, kdežto cíle u dánia 9 + 2 (Kramer-Zucker et al., 2005; Okada et al., 2005).

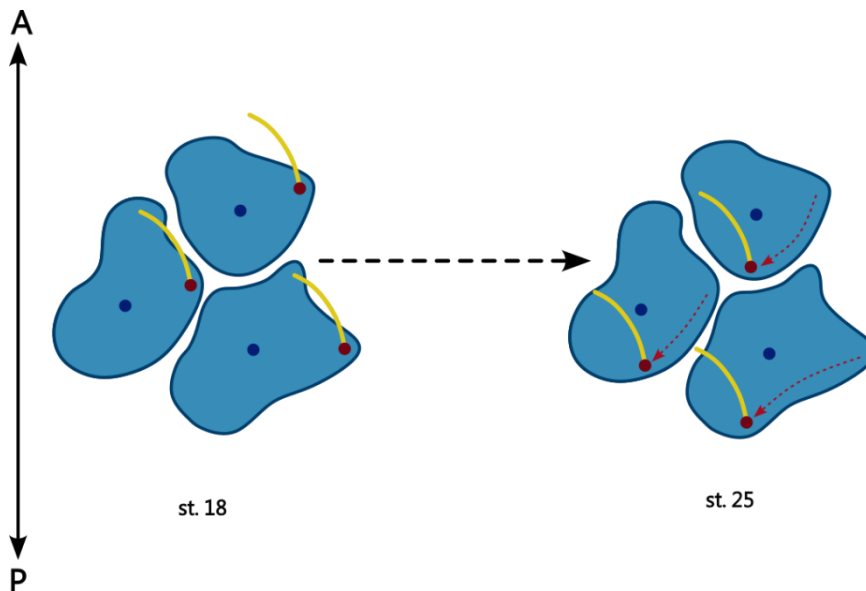
Běžně se s motilními cíli setkáváme právě u konformace 9 + 2 (Satir a Christensen, 2007). To, že se v některých organizátorech vyskytují pohyblivé cíle s konformací 9 + 0 není úplně typické. Většinou takto stavěné cíle pohyblivé nebývají, tudíž prvotní objevení jejich motility u myši bylo celkem překvapivé (Nonaka et al., 1998). Naše snímky z TEM řezů nám však ukázaly, že cíle v GRP jesetera jsou tvořeny 9 + 2 mikrotubulových doubletů (obr. 5.3), z čehož tedy předpokládáme, že jsou tyto cíle pohyblivé a generují levostranný proud.

Pro ověření potřeby výskytu cílů v našem organizátoru jsme provedli farmakologickou inhibici ciliogeneze prostřednictvím inhibitoru Ciliobrevin D. Tento inhibitor blokuje ciliogenezi prostřednictvím inhibice cytoplazmatického dyneinu a dráhy Hedgehog. I když náš poslední experiment naznačuje, že touto inhibicí dochází u embryí jesetera k randomizaci stočení srdeční trubice, tuto hypotézu nelze jednoznačně potvrdit v důsledku nedostatku jedinců, kteří přežili až do potřebného stádia. Nicméně pokud by se toto tvrzení ukázalo jako pravdivé, mohlo by mimo jiné ukazovat i na roli Hedgehog dráhy v determinaci levo-pravé asymetrie jesetera.

Je známo, že u organizátorů levo-pravé asymetrie se během embryonálního vývoje báze cílů pohybují v rámci buňky směrem k posterioru, a zároveň se k posterioru naklánějí. Tato změna umožňuje cílům zefektivnění tvorby levostranného proud prostřednictvím změny rotační elipsy. Kdyby k posteriorizaci nedošlo, v organizátoru by docházelo ke vzniku více malých toků a nevznikl by dostatečně jednotný levostranný proud (Chien et al., 2018; Dasgupta a Amack, 2016; Hashimoto et al., 2010; Okada et al., 2005).

V rámci této práce jsme se posteriorizací cílů v buňkách pokusili ověřit i u cílů gastrocoelní střešní desky jesetera. Nejprve jsme vytvořili předběžné schéma s organizátory ve stádiích 18–25, kde jsme studovali pozici bází cílů v jednotlivých stádiích. Vzhledem k tomu, že se nám na základě tohoto pozorování jevila hypotéza jako pravdivá (obr. 5.6), rozhodli jsme se provést kvantitativní analýzu pozice ciliárních bází.

V rámci analýzy jsme měřili vzdálenosti báze cílů od středu buňky, který byl definován na základě vytvořené elipsy. Přepokládali jsme, že se cíle mladších stádií vyskytují v blízkosti středu buňky a během vývoje se posteriorizací báze vzdálenost od středu zvětšuje. K našemu překvapení se tyto délky u jednotlivých stádií nikterak nelišily, vzdálenosti od středu zůstávaly přibližně konstantní během všech stádií organizátoru. Domnívám se, že těchto výsledků jsme dosáhli proto, že báze cílů se sice mohou nacházet u mladších stádií ve středu buňky, ale pouze v rámci antero-posteriorní osy (obr. 6.1). Pokud by tato hypotéza byla pravdivá, znamenalo by to, že posteriorizace cílů je nezávislá na vzdálenosti od středu. Když vezmeme v potaz i nepravidelné tvary buněk, vzdálenost u posteriorních cílů by dokonce mohla být i kratší než u těch nepolarizovaných, například jednalo by se o buňku protáhlou ve směru levo-pravé osy.



Obrázek 6.1 Mnou navržený způsob trajektorie posteriorizace báze cílů v rámci buňky. Modře jsou znázorněny jednotlivé buňky, žlutě cíle s červenou bází, červené šipky ukazují směr pohybu báze cíle. V porovnání cílů ve stádiích 18 a 25 nedochází k výrazné změně ve vzdálenosti od středu buňky. A = anterior, P = posterior.

Následně jsme k prokázání posteriorizace cílů použili odlišný přístup. V rámci buňky jsme tentokrát neměřili vzdálenost, ale úhel, pod kterým je cíle umístěná od středu buňky. Tato měření potvrdila, že se směr, kterým se cíle pohybují, posouvá během vývoje k posterioru. To lze nejlépe vidět na obrázku 5.8C, kde jsou znázorněny směry všech čtyřech os od středu buňky (anterior, posterior, levá a pravá strana). Pokud porovnáme prvotní stádium 18 se stádiem 25, zjistíme, že většina cílů ve stádiu 18 je umístěna v levo-anteriorním směru, zatímco ve stádiu 25 se nejvíce cílů nachází na posterioru.

Kromě změny pozice cílů dochází v organizátorech levo-pravé asymetrie k prodlužování cílů jako takových. U drápatky se během vývoje GRP cíle prodlouží z 1–2 μ m na 5 μ m (Bellomo et al., 1996; Schweickert et al., 2007). V rámci výzkumu cílů jsme se zaměřili i na jejich délku během vývoje gastrocoelní střešní desky jesetera, kde výsledky potvrdily naši hypotézu o jejich prodlužování (obr. 5.9). Nejkratší cíle byly u jeseterů naměřeny ve stádiu 18. Následně ve stádiu 19 byly signifikantně delší a tato délka zůstávala přibližně stejná až do stádia 22. Zdá se, že k dalšímu prodloužení poté dochází v přechodu na stádium 23 a posléze i 24. I když se cíle jesetera neprodlužují tolik, jako bylo pozorováno u drápatky, cíle ve stádiích 22–24 jsou signifikantně delší v porovnání s počátečním stádiem. Zároveň právě v těchto stádiích, kdy se cíle stávají nejdelšími, signifikantně mění svou pozici směrem k posterioru (obr. 5.8B). Toto období se tak jeví jako zásadní pro tvorbu levostranného proudu.

Následně dochází ke zkrácení cílů, a to ve stádiu 25. Předpokládám, že k této změně dochází v důsledku začátku degradace cílů. Úloha organizátoru levo-pravé asymetrie se už v tomto stádiu blíží ke konci a cíle již nejsou potřebné. Ciliární degradace byla dříve popsána především na Kupfferově váčku dánia, kde buňky organizátoru sice neapoptozují, ale u samotných cílů dochází k rozpadu. Buňky, které pak organizátor tvořily, podstupují epitel-mesenchymální tranzici a podílejí se na vzniku chordy a somitů (Ikeda et al., 2022).

U gastrocoelní střešní desky jesetera jsme pozorovali proces zániku od stádia 26 (obr. 5.20), ve kterém se cíle už téměř nevyskytovaly. Očekáváme, že i v tomto organizátoru buňky nedegradují a podílejí se na vzniku mezodermálních struktur stejně jako bylo navrženo u ostatních obratlovců (Bellomo et al., 1996; Ikeda et al., 2022; Shook et al., 2004).

6.3 Nodal signální dráha v levo-pravé asymetrii jesetera

Za nejdůležitější faktory v určení levo-pravé asymetrie jsou považováni členové Nodal signální dráhy (Blum et al., 2014). Přítomnost proteinu Nodal začíná již v organizátoru, ze kterého následně difunduje do levé laterální mezodermální destičky, kde aktivuje sám sebe, svůj inhibitor Lefty a transkripční faktor Pitx2. Pitx2 je následně tím faktorem, který se objevuje v levostranných nebo asymetrických orgánech (Essner et al., 2000; Logan et al., 1998; Ryan et al., 1998).

V této práci jsme se snažili ověřit funkci Nodal dráhy u jesetera, a to jak na úrovni organizátoru, tak ve stádiích, kde očekáváme tuto dráhu aktivní v levé laterální mezodermální destičce. K dosažení výsledků jsme použili farmakologický inhibitor SB505124, který inhibuje

Aktivinové receptory I umožňující nasednutí Nodal proteinů a následně jsme u jedinců sledovali stočení srdeční trubice. Zajímavé bylo, že ačkoliv se u všech vyzkoušených koncentrací SB505124 vyskytovaly odchylky od normálního srdce (tedy stočeného napravo), se zvyšující se koncentrací SB505124 se měnila procenta ve dvou odlišných případech heterotaxie – buď bylo srdce stočeno na levou stranu, nebo nebylo stočeno vůbec.

U embryí s nejnižší koncentrací SB505124 by se mohlo předpokládat, že dochází k randomizaci stočení srdeční trubice, protože stejné množství jedinců má stočené srdce nalevo jako napravo a pouhé minimum embryí srdce stočené nemá. Když ale vezmeme v potaz zvyšující se koncentrací tohoto inhibitoru, u embryí narůstá množství jedinců s nestočenou srdeční trubicí (obr. 5.12). Tento fakt naznačuje, že funkce Nodal signální dráhy u jesetera není zřejmě jediná, která hraje roli v této determinaci. Lze očekávat, že Nodal signální dráha kooperuje s jinou přítomnou drahou, která ovlivňuje levo-pravou asymetrii srdce, tak jako u jiných obratlovců (Noël et al., 2013). Nabízí se například FGF dráha, která byla ukázána jako nepostradatelná v levo-pravé asymetrii mozku dánia. Konkrétně se jedná o migraci parapineálního orgánu, který za normálních okolností migruje na levou stranu. Nodal je zde zodpovědný pouze za to, že určuje směr migrace (tedy na levou stranu), ale za samotný přesun je zodpovědná FGF dráha. V nepřítomnosti Nodal dráhy pak dochází k migraci na náhodnou stranu, ale bez FGF nedochází k přesunu vůbec (Regan et al., 2009).

Posléze jsme provedli farmakologickou inhibici s využitím 10 μ M SB505124 jako koncentrace s největším podílem embryí s levo-pravou poruchou srdce. Experiment byl proveden celkem ve třech nezávislých opakování a ve všech třech případech se shodoval na výsledku. U většiny jedinců docházelo díky inhibici k nestočení srdeční trubice (obr. 5.13).

Stejný postup inhibice s 10 μ M SB505124 jsme provedli i u embryí s již zaniklým organizátorem levo-pravé asymetrie, kdy jsme očekávali přítomnost Nodal dráhy v levé laterální mezodermální destičce. Inhibovaná embrya vykazovala stejný poměr levého stočení srdce jako pravého a k nim poloviční počet jedinců s nestočeným srdcem, tedy 2:2:1. Z tohoto experimentu se zdá, že při inhibici Nodal dráhy ve stádiích se zaniklým organizátorem dochází spíše k randomizaci stočení srdeční trubice. Pro ověření této hypotézy by bylo potřeba experiment vícekrát zopakovat a posoudit, zdali jsou výsledky konzistentní.

U embryí s inhibovanou Nodal dráhou jsme kromě stočení srdce ověřovali i přítomnost exprese transkripčního faktoru *Pitx2*, který v mozku zajišťuje levo-pravou morfologickou asymetrii struktur, jako jsou habenula a parapineální orgán (Concha et al., 2000). U jesetera se *Pitx2* v levé části středního mozku exprimuje od stádia 35. Expresi *Pitx2* jsme testovali na

všech třech fenotypech stočení srdce a výsledky byly poměrně překvapivé. U žádného z inhibovaných embryí nedocházelo k expresi *Pitx2* v mozku, a to nezávisle na jejich stočení srdce. I když se jedinec podle fenotypu srdce jevil stejný s kontrolním, i v tomto případě exprese v mozku nebyla pozorována (obr. 5.15).

Ze získaných výsledků inhibice Nodal signální dráhy tedy vyplývá, že funkce Nodal dráhy je důležitá jak ve stádiích gastrocoelní střešní desky, tak ve stádiích, kde je tento organizátor již zaniklý. Co se týče následné funkce, zdá se, že v jednotlivých orgánech je její regulace individuální v každém z nich nezávisle na sobě.

6.4 Protonové pumpy v levo-pravé asymetrii jesetera

K předurčení levo-pravé asymetrie těla se podílí kromě organizátoru více aktérů, a to až už ještě před jeho vznikem nebo následně po jeho zániku. Jednu z hlavních úloh hrají především protonové pumpy. Nejčasnější rozdíl v levo-pravé asymetrii byl u drápatky pozorován již ve stádiu dvou buněk, a to expresí genů pro H+K+-ATPázu a H+V-ATPázu. Farmakologická inhibice těchto pump následně způsobuje defekty v levo-pravé asymetrii vnitřních orgánů, jako je stočení srdce a střev (Adams et al., 2006; Levin et al., 2002). Funkce H+K+-ATPázy v levo-pravé asymetrii byla také ukázána například u bezobratlého strunatce – kopinatce (Soukup, 2017).

Nás zajímalo, zdali protonové pumpy fungují asymetricky i během vývoje jesetera. Provedli jsme farmakologickou inhibici H+K+-ATPázy, na kterou jsme využili dva inhibitory – SCH28080 a Omeprazol. Na stádiích blastuly byla embrya inhibovaná dvěma koncentracemi SCH28080 a ponechána vývoji až do stádií 36–38, kde při normálních podmínkách dochází ke stočení srdeční trubice na pravou stranu. Veškerí jeseteři vyvíjející se v tomto inhibitoru nevykazovali žádné stočení srdeční trubice, což naznačuje nutnost funkce H+K+-ATPázy v těchto stádiích (obr. 5.16). Opět jsme se však potýkali s poměrně vysokou úmrtností a pro potvrzení této teorie by bylo potřeba experiment zopakovat s vyšší mírou přeživších jedinců. Naopak při inhibici Omeprazolem jsme žádné významné odchylky ve stočení srdeční trubice nepozorovali (obr. 5.17). Příčinou může být samozřejmě to, že při experimentech s Omeprazolem nebyly použity dostatečné koncentrace, které by mohly mít efekt na fenotyp.

Dále jsme testovali, zda je funkce H+K+-ATPázy nezbytná přímo v organizátoru levo-pravé asymetrie, ve kterém nebyla funkce této pumpy podrobně zkoumána. Opět jsme použili stejné farmakologické inhibitory – SCH28080 a Omeprazol a nechali embrya vyvinout

do stádií, kde se stáčí srdeční trubice. Naše výsledky neprokázaly u obou použitých inhibitorů žádné odchylky ve stočení srdce v porovnání s kontrolními jedinci z čehož usuzujeme, že jejich funkce není pravděpodobně nezbytná přímo v organizátoru levo-pravé asymetrie (obr. 5.18; 5.19).

6.5 Evoluce organizátoru levo-pravé asymetrie

Gastrocoelní střešní deska je v literatuře popisována vždy jako organizátor levo-pravé asymetrie obojživelníků (Blum et al., 2009a; Chien et al., 2018; Saenz-Ponce et al., 2012; Schweickert et al., 2007). Naše výsledky ukazují, že obojživelníci nejsou jediná skupina, kde se s touto strukturou setkáváme. Obojživelníci a časně se odvětvující paprskoploutvé ryby mají mnoho společného během celého embryonálního vývoje, takže by nebylo tolik překvapivé, kdyby se podobali i v determinaci levo-pravé asymetrie. Společné znaky se objevují již při prvním dělení buňky, kdy dochází u obou těchto skupin k holoblastickému rýhování a následně stejným mechanismem gastrulace, tedy involucí (Takeuchi et al., 2009). Naproti tomu u teleostních ryb se setkáváme s meroblastickým rýhováním, hlavním gastrulačním pohybem je považována epibolie a na rozdíl od obojživelníků nemají archenteron (Timmermans, 1987). S tím souvisí i rozdíl v organizátoru levo-pravé asymetrie Teleostei, kterým je Kupfferův váček (Essner et al., 2005). Tato struktura se liší dokonce i u jednotlivých teleostních druhů, například u dánia ciliární buňky obklopují celý váček, kdežto u medaky japonské (*Oryzias latipes*) se vyskytují pouze na dorzální straně (obr. 5.21).

Pro potvrzení hypotézy, že se gastrocoelní střešní deska nachází u všech ne-teleostních paprskoploutvých ryb, jsme se kromě jesetera zaměřili na další dva zástupce této skupiny – bichira a kostlína, a také na zástupce ocasečných obojživelníků – axolotla. Pomocí SEM jsme u obou těchto druhů v oblasti blastoporu pozorovali strukturu připomínající gastrocoelní střešní desku (obr. 5.21). Při větším zvětšení na její buňky jsme dokonce zaznamenali cílie, které byly srovnatelné s těmi nalezenými u jeseteřího organizátoru. Tvarově se organizátor levo-pravé asymetrie bichira, jesetera a kostlína mírně lišil v tom, že o čím dříve odvětvěnou skupinu se jednalo (v tomto případě o bichira), tím byl tento organizátor protáhlejší směrem k anterioru.

Naše pozorování tak odpovídají hypotéze, že gastrocoelní střešní deska je původním stavem organizátoru nejen pro obojživelníky, ale také pro ne-teleostní paprskoploutvé ryby. Kupfferův váček by pak vznikl až následně v průběhu evoluce jako odvozený stav GRP (Blum et al., 2009b).

Pro skupinu Teleostei obecně platí, že se u nich setkáváme s řadou odvozených znaků, za to by se víceméně dal považovat i jejich časný embryonální vývoj zmíněný výše. Ke vzniku těchto znaků pravděpodobně došlo v důsledku celogenomové duplikace, která proběhla u společného předka Teleostei a umožnila této skupině specializaci genů. S tím samozřejmě souvisí i jejich obrovská druhová diverzita, která násobně převyšuje ne-teleostní ryby (Glasauer a Neuhauss, 2014). V tomto kontextu by bylo zajímavé sledovat organizátory levo-pravé asymetrie u záhy se odvětvujících teleostních skupin, jako jsou například rypouni.

Naše výsledky studia gastrocoelní střešní desky jako organizátoru levo-pravé asymetrie tak potvrzují přítomnost této struktury u ne-teleostních paprskoploutvých ryb a podporují hypotézu o evolučním původu Kupfferova váčku právě z této struktury.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo popsat morfologii a funkci gastrocoelní střešní desky jako organizátoru levo-pravé asymetrie u doposud nezkoumaného druhu – jesetera malého (*Acipenser ruthenus*). Gastrocoelní střešní deska byla tradičně považována pouze za organizátor levo-pravé asymetrie obojživelníků. Naše data však ukazují, že se jedná o strukturu rozšířenou i u ne-teleostních paprskoploutvých ryb. Embryonální vývoj obojživelníků a časně se odvětvujících skupin ryb nese mnoho společných znaků, je tak předpokladatelné, že u těchto druhů probíhají shodné procesy i v rámci determinace levo-pravé asymetrie těla.

U jesetera malého se gastrocoelní střešní deska objevuje v období neurulace, tedy stádiích 18–25, kdy vytváří kapkovitou strukturu obklopující blastoporus. Buňky tohoto organizátoru jsou monociliární, přičemž jednotlivé cílie mají konformaci 9 + 2 mikrotubulových doubletů. Předpokládáme, že jsou tyto cílie pohyblivé stejně jako cílie ostatních organizátorů levo-pravé asymetrie. Naše výsledky naznačují, že při farmakologické inhibici ciliogeneze u jeseteřích embryí dochází k defektům v levo-pravé asymetrii.

Během vývoje organizátoru cílie mění svou pozici v buňce směrem k posterioru. K tomuto procesu dochází postupně od stádia 18, kdy jsme pozorovali většinu cílů na levo-anteriorní straně. Naopak nejvíce posteriorizovaných cílů se ukázalo být ve stádiu 25. Kromě pozice, cílie také prodlužují svou délku. K největším změnám dochází v rozmezí stádií 18–19 a 22–24. Ve stádiu 25 se cílie začínají opět zkracovat, což by se dalo vysvětlit začátkem jejich degradace na konci funkčního období gastrocoelní střešní desky. Buňky tohoto organizátoru začínají podstupovat involuci od stádia 26 a následně jsou posledně spatřeny ve stádiu 28. Vzhledem k již dříve popsaným mechanismům zániků organizátorů levo-pravé asymetrie je velmi pravděpodobné, že stejně tak jako u ostatních obratlovců, podstupují buňky posléze epitel-mesenchymální tranzici a podílejí se na vzniku chordy a somitů.

Dále jsme testovali funkci H⁺K⁺-ATPázy v levo-pravé asymetrii jesetera pomocí farmakologické inhibice. Naše výsledky se přiklánějí k roli této protonové pumpy ve stádiích blastuly, ovšem co se týče samotné gastrocoelní střešní desky, nebyla zde její funkce potvrzena.

Velmi důležitou součástí této studie je také potvrzení Nodal signální dráhy v determinaci levo-pravé asymetrie jesetera. Funkčnost zmíněné dráhy jsme ověřovali pomocí farmakologické inhibice receptorů pro Nodal proteiny. Při opakovaných experimentech naše výsledky ukázaly odchylky fenotypů inhibovaných jedinců, a to konkrétně ve stočení srdeční trubice. Při inhibici Nodal dráhy v průběhu vývoje organizátorů u většiny testovaných embryí docházelo k nestočení srdeční trubice ve stádiích, kde má být stočena na pravou stranu.

Menšina embryí také měla srdce naopak stočené na levou stranu. Další výsledky jsme získali u embryí inhibovaných až ve stádiích, kdy předpokládáme, že se Nodal dráha nachází v levé laterální mezodermální destičce. Zde byla pozorována větší variabilita a většina embryí měla srdce stočené buď na pravou nebo na levou stranu.

U inhibovaných embryí jsme pozorovali i expresi *Pitx2* v mozku, která se u kontrol vyskytovala v levé část středního mozku. Ani u jednoho z inhibovaných jedinců jsme nepozorovali expresi *Pitx2* v mozku, a to nezávisle na jejich stočení srdeční trubice. Experimenty naznačují, že Nodal dráha tak nemusí být jediná dráha při determinaci levo-pravé asymetrie a pravděpodobně interaguje s další signální dráhou nezávisle v každém levostranném či asymetrickém orgánu jesetera.

Kromě jesetera jsme potvrdili přítomnost gastrocoelní střešní desky u dalších dvou druhů ne-teleostních paprskoploutvých ryb, u bichira a kostlína. Tímto jsme přispěli k potvrzení teorie, že se tato struktura vyskytuje u celé této skupiny a jeví se jako původní organizátor levo-pravé asymetrie těla ryb, ze kterého byl až následně odvozen Kupfferův váček.

8 Seznam zkratek

| | |
|-----------|--|
| ActRIB | Activin receptor type I B |
| ActRIIA | Activin receptor type II A |
| ActRIIB | Activin receptor type II B |
| ALK4 | Activin receptor-like kinase 4 |
| CAMK-II | Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II |
| KIF | Kinesin family member |
| KV | Kupffer's vesicle |
| Dand5 | DAN domain family member 5 |
| Dnah5 | Dynein axonemal heavy chain 5 |
| Dmrt2 | Doublesex and mab3-related transcription factor2 |
| EGF-CFC | Epidermal growth factor – Cripto1 FRL1 Cryptic |
| eHand | Heart – and neural crest derivatives-expressed protein |
| Fast | Fas activated serin/thereonin kinase |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| FGFR1 | Fibroblast growth factor receptor 1 |
| FoxH1 | Forkhead box H1 |
| Foxj1 | Forkhead box J1 |
| GRP | Gastrocoel roof plate |
| IP3 | Inositol 1,4,5-trisphosphate |
| Lefty | Left-right determination factor |
| Lrd | Left-right dynein |
| Nkx2-5 | NK2 Transcription factor related, locus 5 |
| Nodal | Nodal growth differentiation factor |
| NVP | Nodal vesicular parcels |
| PCP | Planar cell polarity |
| Pkd1/Pkd2 | Polycystin-1/Polycystin-2 |
| Pitx2 | Paired-like homeodomain transcription factor 2 |
| RYR3 | Ryanodine receptor 3 |

| | |
|-------------|------------------------------------|
| Smad | Sma and Mad-related protein |
| Spc1 | Sparse coat 1 |
| Spc4 | Sparse coat 4 |
| TGF β | Transforming growth factor β |
| Wnt | Wingless/Int-1 |
| Xnr | Xenopus nodal-related protein |

9 Použitá literatura

- Adams, D.S., Robinson, K.R., Fukumoto, T., Yuan, S., Albertson, R.C., Yelick, P., Kuo, L., McSweeney, M., Levin, M., 2006. Early, H⁺-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. *Development* 133, 1657–1671. <https://doi.org/10.1242/dev.02341>
- Afzelius, B. A., 1976. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science*, 193, 317–319. <https://doi.org/10.1126/science.1084576>
- Alward, W. L., Semina, E. V., Kalenak, J. W., Héon, E., Sheth, B. P., Stone, E. M., & Murray, J. C., 1998. Autosomal dominant iris hypoplasia is caused by a mutation in the Rieger syndrome (RIEG/PITX2) gene. *American Journal of Ophthalmology*, 125, 98–100. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(99\)80242-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(99)80242-6)
- Bartram, U., Wirbelauer, J., Speer, C.P., 2005. Heterotaxy syndrome - Asplenia and polysplenia as indicators of visceral malposition and complex congenital heart disease. *Biology of the Neonate* 88, 278–290. <https://doi.org/10.1159/000087625>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Basu, B., Brueckner, M., 2008. Chapter Six Cilia. Multifunctional Organelles at the Center of Vertebrate Left-Right Asymmetry, *Current Topics in Developmental Biology* 85, 151–174. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00806-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00806-5)
- Beck, S., Le Good, J.A., Guzman, M., Haim, N. Ben, Roy, K., Beermann, F., Constam, D.B., 2002. Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nature Cell Biology* 4, 981–985. <https://doi.org/10.1038/ncb890>
- Bell, E., Muñoz-Sanjuán, I., Altmann, C.R., Vonica, A., Brivanlou, A.H., 2003. Cell fate specification and competence by Coco, a maternal BMP, TGF β and Wnt inhibitor. *Development* 130, 1381–1389. <https://doi.org/10.1242/dev.00344>
- Bellomo, D., Lander, A., Harragan, L., Brown, N.A., 1996. Cell proliferation in mammalian gastrulation: The ventral node and notochord are relatively quiescent. *Developmental*

- Dynamics 205, 471–485. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199604\)205:4<471::AID-AJA10>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199604)205:4<471::AID-AJA10>3.0.CO;2-4)
- Beyer, T., Danilchik, M., Thumberger, T., Vick, P., Tisler, M., Schneider, I., Bogusch, S., Andre, P., Ulmer, B., Walentek, P., Niesler, B., Blum, M., Schweickert, A., 2012. Serotonin signaling is required for Wnt-dependent GRP specification and leftward flow in *Xenopus*. *Current Biology* 22, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.027>
- Biben, C., Harvey, R.P., 1997. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes & Development* 11, 1357–1369. <https://doi.org/10.1101/gad.11.11.1357>
- Bisgrove, B.W., Essner, J.J., Yost, H.J., 1999. Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling. *Development* 126, 3253–3262. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3253>
- Blum, M., Beyer, T., Weber, T., Vick, P., Andre, P., Bitzer, E., Schweickert, A., 2009a. *Xenopus*, an ideal model system to study vertebrate left-right asymmetry. *Developmental Dynamics* 238, 1215–1225. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21855>
- Blum, M., Feistel, K., Thumberger, T., Schweickert, A., 2014. The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. *Development* 141, 1603–1613. <https://doi.org/10.1242/dev.100560>
- Blum, M., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., 2009b. Evolution of leftward flow. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.11.005>
- Bolker, J.A., 1993. Gastrulation and mesoderm morphogenesis in the white sturgeon. *Journal of Experimental Zoology* 266, 116–131. <https://doi.org/10.1002/jez.1402660206>
- Bonnelykke, T., Chabry, M. A., Perthame, E., Desgrange, A., & Meilhac, S. (2024). Notch3 is a genetic modifier of Nodal signalling for patterning asymmetry during mouse heart looping. *bioRxiv*, 2024–03. <https://doi.org/10.1101/2024.03.25.586543>
- Brummett, A.R., Dumont, J.N., 1978. Kupffer's vesicle in *Fundulus heteroclitus*: A scanning and transmission electron microscope study. *Tissue Cell* 10, 11–22. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(78\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0040-8166(78)90003-4)
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., Van Bebber, F., Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R., Blum, M., 1999. The homeobox

- gene *Pitx2*: Mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* 126, 1225–1234. <https://doi.org/10.1242/dev.126.6.1225>
- Caron, A., Xu, X., Lin, X., 2012. Wnt/ β -catenin signaling directly regulates *Foxj1* expression and ciliogenesis in zebrafish Kupffer's vesicle. *Development* 139, 514–524. <https://doi.org/10.1242/dev.071746>
- Chien, Y., Srinivasan, S., Keller, R., Kintner, C., Chien, Y., Srinivasan, S., Keller, R., Kintner, C., 2018. Mechanical strain determines cilia length, motility, and planar position in the left-right asymmetry. *Developmental Cell* 45, 316–330.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.04.007>
- Concha, M.L., Burdine, R.D., Russell, C., Schier, A.F., Wilson, S.W., 2000. A Nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron* 28, 399–409. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00120-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00120-3)
- Concha, M.L., Reig, G., 2022. Origin, form and function of extraembryonic structures in teleost fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 377, 20210264. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0264>
- Concha, M.L., Wilson, S.W., 2001. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *Journal of Anatomy* 199, 63–84. <https://doi.org/10.1017/S0021878201008329>
- Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B., Robertson, E. J., 1994. A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 12, 1919–1928. <https://doi.org/10.1242/dev.120.7.1919>
- Cooke, J., 1995. Vertebrate embryo handedness. *Nature* 374, 681. <https://doi.org/10.1038/374681a0>
- Cooper, M.S., Virta, V.C., 2007. Evolution of gastrulation in the ray-finned (actinopterygian) fishes. *Journal of Experimental Zoology* 308, 591–608. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21142>
- Dasgupta, A., Amack, J.D., 2016. Cilia in vertebrate left - Right patterning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371, 20150410. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0410>

- Delarue, M., Johnson, K. E., & Boucaut, J. C., 1994. Superficial cells in the early gastrula of *Rana pipiens* contribute to mesodermal derivatives. *Developmental biology* 165, 702–715. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1286>
- Dettlaff, T. A. and Ginsburg, A. S., 1993. *Sturgeon Fishes, Developmental Biology and Aquaculture*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77057-9>
- Djenoune, L., Mahamdeh, M., Truong, T. V, Nguyen, C.T., 2023. Cilia function as calcium-mediated mechanosensors that instruct left-right asymmetry. *Science* 78, 71–78. <https://doi.org/10.1126/science.abq7317>
- Essner, J.J., Amack, J.D., Nyholm, M.K., Harris, E.B., Yost, H.J., 2005. Kupffer’s vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 132, 1247–1260. <https://doi.org/10.1242/dev.01663>
- Essner, J.J., Branford, W.W., Zhang, J., Yost, H.J., 2000. Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by *pitx2* isoforms. *Development*. 27, 1081–93. <https://doi.org/10.1242/dev.127.5.1081>
- Essner, J.J., Vogan, K.J., Wagner, M.K., Tabin, C.J., Yost, H.J., Brueckner, M., 2002. Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* 418, 37–38. <https://doi.org/10.1038/418037a>
- Feistel, K., Blum, M., 2006. Three types of cilia including a novel 9+4 axoneme on the notochordal plate of the rabbit embryo. *Developmental Dynamics* 235, 3348–3358. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20986>
- Francescato, L., Rothschild, S.C., Myers, A.L., Tombes, R.M., 2010. The activation of membrane targeted CaMK-II in the zebrafish Kupffer’s vesicle is required for left-right asymmetry. *Development* 137, 2753–2762. <https://doi.org/10.1242/dev.049627>
- Germain, S., Howell, M., Esslemont, G.M., Hill, C.S., 2000. Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes & Development* 14, 435–451. <https://doi.org/10.1101/gad.14.4.435>
- Gibbons, I.R., Grimstone, A. V., 1960. On flagellar structure in certain flagellates. *The Journal of Cell Biology* 7, 697–716. <https://doi.org/10.1083/jcb.7.4.697>

- Glasauer, S.M.K., Neuhauss, S.C.F., 2014. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics* 289, 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W.S., Schier, A.F., 1999. The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97, 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80720-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80720-5)
- Guglielmotti, V., Cristino, L., 2006. The interplay between the pineal complex and the habenular nuclei in lower vertebrates in the context of the evolution of cerebral asymmetry. *Brain Research Bulletin* 69, 475–488. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.03.010>
- Hashimoto, H., Rebagliati, M., Ahmad, N., Muraoka, O., Kurokawa, T., Hibi, M., Suzuki, T., 2004. The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish. *Development* 131, 1741–1753. <https://doi.org/10.1242/dev.01070>
- Hashimoto, M., Shinohara, K., Wang, J., Ikeuchi, S., Yoshida, S., Meno, C., Nonaka, S., Takada, S., Hatta, K., Wynshaw-Boris, A., Hamada, H., 2010. Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia. *Nature Cell Biology* 12, 170–176. <https://doi.org/10.1038/ncb2020>
- Hatayama, M., Mikoshiba, K., Aruga, J., 2011. IP3 signaling is required for cilia formation and left-right body axis determination in *Xenopus* embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410, 520–524. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.014>
- Hojo, M., Takashima, S., Kobayashi, D., Sumeragi, A., Shimada, A., Tsukahara, T., Yokoi, H., Narita, T., Jindo, T., Kage, T., Kitagawa, T., Kimura, T., Sekimizu, K., Miyake, A., Setiamarga, D., Murakami, R., Tsuda, S., Ooki, S., Kakihara, K., Naruse, K., Takeda, H., 2007. Right-elevated expression of charon is regulated by fluid flow in medaka Kupffer's vesicle. *Development, Growth & Differentiation* 49, 395–405. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00937.x>
- Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., Harland, R.M., 1998. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Molecular Cell* 1, 673–683. <https://doi.org/10.1016/S1097->

- Ikeda, T., Inamori, K., Kawanishi, T., Takeda, H., 2022. Reemployment of Kupffer's vesicle cells into axial and paraxial mesoderm via transdifferentiation. *Development, Growth & Differentiation* 64, 163–177. <https://doi.org/10.1111/dgd.12774>
- Jones, C.M., Kuehn, M.R., Hogan, B.L.M., Smith, J.C., Wright, C.V.E., 1995. Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* 121, 3651–3662. <https://doi.org/10.1242/dev.121.11.3651>
- Joseph, E.M., Melton, D.A., 1997. Xnr4: A *Xenopus* nodal-related gene expressed in the Spemann organizer. *Developmental Biology* 184, 367–372. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8510>
- Juan, H., Hamada, H., 2001. Roles of nodal-lefty regulatory loops in embryonic patterning of vertebrates. *Genes to Cells* 6, 923–930. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00481.x>
- Kajikawa, E., Miki, T., Takeda, M., Kiyonari, H., Hamada, H., 2022. Left-right asymmetric expression of the *Nodal-Lefty-Pitx2* module in developing turtle forebrain. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.929808>
- Kamura, K., Kobayashi, D., Uehara, Y., Koshida, S., Iijima, N., Kudo, A., Yokoyama, T., Takeda, H., 2011. Pkd111 complexes with Pkd2 on motile cilia and functions to establish the left-right axis. *Development* 138, 1121–1129. <https://doi.org/10.1242/dev.058271>
- Kawasumi, A., Nakamura, T., Iwai, N., Yashiro, K., Saijoh, Y., Belo, J.A., Shiratori, H., Hamada, H., 2011. Left-right asymmetry in the level of active Nodal protein produced in the node is translated into left-right asymmetry in the lateral plate of mouse embryos. *Developmental Biology* 353, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.009>
- Keller, R.E., Danilchik, M., Gimlich, R., 1985. The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* 89, 185–209. <https://doi.org/10.1242/dev.89.supplement.185>
- Koin, U., Winklbauer, R., Nagel, M., Selchow, A., Wacker, S., 1996. Mesoderm migration in the *Xenopus* gastrula. *International Journal of Developmental Biology* 40, 305–311.
- Kramer-Zucker, A.G., Olale, F., Haycraft, C.J., Yoder, B.K., Schier, A.F., Drummond, I.A., 2005. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is

- required for normal organogenesis. *Development* 132, 1907–1921. <https://doi.org/10.1242/dev.01772>
- Kreiling, J.A., Prabhat, Williams, G., Creton, R., 2007. Analysis of Kupffer's vesicle in zebrafish embryos using a cave automated virtual environment. *Developmental Dynamics* 236, 1963–1969. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21191>
- Kupffer, C., 1868. Beobachtungen über die Entwicklung. *Anatomie* 209–272.
- Lagadec, R., Laguerre, L., Menuet, A., Amara, A., Rocancourt, C., Péricard, P., Godard, B.G., Celina Rodicio, M., Rodriguez-Moldes, I., Mayeur, H., Rougemont, Q., Mazan, S., Boutet, A., 2015. The ancestral role of nodal signalling in breaking L/R symmetry in the vertebrate forebrain. *Nature Communications* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms7686>
- Lanoizelet, M., Michel, L., Lagadec, R., Mayeur, H., Guichard, L., Severac, D., & Mazan, S., 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. <https://doi.org/10.1101/2023.10.17.562666>
- Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K.R., Nogi, T., Mercola, M., 2002. Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00939-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00939-X)
- Logan, M., Pagán-Westphal, S.M., Smith, D.M., Paganessi, L., Tabin, C.J., 1998. The transcription factor *pitx2* mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 94, 307–317. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81474-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81474-9)
- Lohr, J.L., Danos, M.C., Yost, H.J., 1997. Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development. *Development* 124, 1465–1472. <https://doi.org/10.1242/dev.124.8.1465>
- Long, S., Ahmad, N., Rebagliati, M., 2003. The zebrafish nodal-related gene *southpaw* is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development* 130, 2303–2316. <https://doi.org/10.1242/dev.00436>
- Lopes, S. S., Lourenço, R., Pacheco, L., Moreno, N., Kreiling, J., & Saúde, L., 2010. Notch signalling regulates left-right asymmetry through ciliary length control. *Development* 137, 3625–3632. <https://doi.org/10.1242/dev.054452>

- Marcon, L., Sharpe, J., 2012. Turing patterns in development: What about the horse part? *Current Opinions in Genetetics & Development* 22, 578–584. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.11.013>
- Marques, S., Borges, A.C., Silva, A.C., Freitas, S., Cordenonsi, M., Belo, J.A., 2004. The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis. *Genes & Development* 18, 2342–2347. <https://doi.org/10.1101/gad.306504>
- McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., Brueckner, M., 2003. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 114, 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00511-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00511-7)
- Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S., Hamada, H., 1997. Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: Their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes to Cells* 2, 513–524. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1997.1400338.x>
- Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y., Hamada, H., 1996. Left-right asymmetric expression of the TGF β -family member *lefty* in mouse embryos. *Nature* 381, 151–155. <https://doi.org/10.1038/381151a0>
- Minarik, M., Stundl, J., Fabian, P., Jandzik, D., Metscher, B.D., Psenicka, M., Gela, D., Osorio-Pérez, A., Arias-Rodriguez, L., Horáček, I., Cerny, R., 2017. Pre-oral gut contributes to facial structures in non-Teleost fishes. *Nature* 547, 209–212. <https://doi.org/10.1038/nature23008>
- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., Kimberling, W.J., Breuning, M.H., Deltas, C.C., Peters, D.J.M., Somlo, S., 1996. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339–1342. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1339>
- Montenegro-Johnson, T.D., Baker, D.I., Smith, D.J., Lopes, S.S., 2016. Three-dimensional flow in Kupffer’s Vesicle. *Journal of Mathematical Biology* 73, 705–725. <https://doi.org/10.1007/s00285-016-0967-7>
- Morgan, M.J., O’Donnell, J.M., Oliver, R.F., 1973. Development of left-right asymmetry in the habenular nuclei of *Rana Temporaria*. *Journal of Comparative Neurology* 149, 203–

214. <https://doi.org/10.1002/cne.901490206>

- Nakamura, T., Mine, N., Nakaguchi, E., Mochizuki, A., Yamamoto, M., Yashiro, K., Meno, C., Hamada, H., 2006. Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system. *Developmental Cell* 11, 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.08.002>
- Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E.H., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., Ingber, D.E., Zhou, J., 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics* 33, 129–137. <https://doi.org/10.1038/ng1076>
- Neugebauer, J.M., Amack, J.D., Peterson, A.G., Bisgrove, B.W., Yost, H.J., 2009. FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature* 458, 651–654. <https://doi.org/10.1038/nature07753>
- Noël, E. S., Verhoeven, M., Lagendijk, A. K., Tessadori, F., Smith, K., Choorapoikayil, S., ... & Bakkens, J., 2013. A Nodal-independent and tissue-intrinsic mechanism controls heart-looping chirality. *Nature Communications*, 4, 2754. <https://doi.org/10.1038/ncomms3754>
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., Hamada, H., 2002. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418, 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature00849>
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., Hirokawa, N., 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, 829–837. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81705-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81705-5)
- Nonaka, S., Yoshida, S., Watanabe, D., Ikeuchi, S., Goto, T., Marshall, W.F., Hamada, H., 2005. De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia. *PLoS Biology* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030268>
- Norris, D.P., 2012. Cilia , calcium and the basis of left-right asymmetry. *BMC Biology*, 10, 1-8. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-102>
- Oh, S.P., Li, E., 1997. The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes & Development* 11, 1812–1826. <https://doi.org/10.1101/gad.11.14.1812>

- Okabe, N., Xu, B., Burdine, R.D., 2008. Fluid dynamics in zebrafish Kupffer's vesicle. *Developmental Dynamics* 237, 3602–3612. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21730>
- Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Belmonte, J.C.I., Hirokawa, N., 2005. Mechanism of nodal flow: A conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121, 633–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.008>
- Olbrich, H., Häffner, K., Kispert, A., Völkel, A., Volz, A., Sasmaz, G., Reinhardt, R., Hennig, S., Lehrach, H., Konietzko, N., Zariwala, M., Noone, P.G., Knowles, M., Mitchison, H.M., Meeks, M., Chung, E.M.K., Hildebrandt, F., Sudbrak, R., Omran, H., 2002. Mutations in *Dnah5* cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nature Genetics* 30, 143–144. <https://doi.org/10.1038/ng817>
- Onuma, Y., Takahashi, S., Yokota, C., Asashima, M., 2002. Multiple nodal-related genes act coordinately in *Xenopus* embryogenesis. *Developmental Biology* 241, 94–105. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0493>
- Osada, S.I., Saijoh, Y., Frisch, A., Yeo, C.Y., Adachi, H., Watanabe, M., Whitman, M., Hamada, H., Wright, C.V.E., 2000. Activin/Nodal responsiveness and asymmetric expression of a *Xenopus nodal-related* gene converge on a FAST-regulated module in intron 1. *Development* 127, 2503–2514. <https://doi.org/10.1242/dev.127.11.2503>
- Palma, K., Signore, I.A., Meynard, M.M., Ibarra, J., Armijo-Weingart, L., Cayuleo, M., Härtel, S., Concha, M.L., 2022. Ontogenesis of the asymmetric parapineal organ in the zebrafish epithalamus. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.999265>
- Park, T.J., Mitchell, B.J., Abitua, P.B., Kintner, C., Wallingford, J.B., 2008. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nature Genetics* 40, 871–879. <https://doi.org/10.1038/ng.104>
- Patterson, K.D., Drysdale, T.A., Krieg, P.A., 2000. Embryonic origins of spleen asymmetry. *Development* 127, 167–175. <https://doi.org/10.1242/dev.127.1.167>
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., De Robertis, E.M., 1999. The head inducer cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707–710. <https://doi.org/10.1038/17820>
- Piedra, M.E., Icardo, J.M., Albajar, M., Rodriguez-Rey, J.C., Ros, M.A., 1998. *Pitx2*

- participates in the late phase of the pathway controlling left- right asymmetry. *Cell* 94, 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81475-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81475-0)
- R Core Team, 2000. R language definition. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 3, 116.
- Ramsdell, A.F., 2005. Left-right asymmetry and congenital cardiac defects: Getting to the heart of the matter in vertebrate left-right axis determination. *Developmental Biology* 288, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.07.038>
- Rebagliati, M.R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P., Dawid, I.B., 1998. Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Developmental Biology* 199, 261–272. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8935>
- Regan, J.C., Concha, M.L., Roussigne, M., Russell, C., Wilson, S.W., 2009. An Fgf8-dependent bistable cell migratory event establishes CNS asymmetry. *Neuron* 61, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.030>
- Ryan, A.K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., De La Peña, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., Norris, D.P., Robertson, E.J., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G., Belmonte, J.C.I., 1998. Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 394, 545–551. <https://doi.org/10.1038/29004>
- Sáenz-Ponce, N., Santillana-Ortiz, J. D., & del Pino, E. M., 2012. The gastrocoel roof plate in embryos of different frogs. *Differentiation*, 83, S62-S66. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.008>
- Satir, P., Christensen, S.T., 2008. Structure and function of mammalian cilia. *Histochememistry and Cell Biology* 129, 687–693. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0416-9>
- Satir, P., Christensen, S.T., 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual Review of Physiology* 69, 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>
- Sato, Y., Nishida, M., 2010. Teleost fish with specific genome duplication as unique models of vertebrate evolution. *Environmental Biology of Fishes* 88, 169–188. <https://doi.org/10.1007/s10641-010-9628-7>

- Schier, A.F., Shen, M.M., 2000. Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 403, 385–389. <https://doi.org/10.1038/35000126>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider, I., Kreis, J., Schweickert, A., Blum, M., Vick, P., 2019. A dual function of FGF signaling in *Xenopus* left-right axis formation. *Development*. 146. <https://doi.org/10.1242/dev.173575>
- Schweickert, A., Campione, M., Steinbeisser, H., Blum, M., 2000. Pitx2 isoforms: Involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mechanisms of Development* 90, 41–51. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00227-0)
- Schweickert, A., Steinbeisser, H., & Blum, M., 2001. Differential gene expression of *Xenopus Pitx1*, *Pitx2b* and *Pitx2c* during cement gland, stomodeum and pituitary development. *Mechanisms of Development*, 107, 191–194. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00461-0)
- Schweickert, A., Vick, P., Getwan, M., Weber, T., Schneider, I., Eberhardt, M., Beyer, T., Pachur, A., Blum, M., 2010. The Nodal Inhibitor Coco Is a Critical Target of Leftward Flow in *Xenopus*. *Current Biology* 20, 738–743. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.061>
- Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K., Blum, M., 2007. Cilia-driven leftward flow determines Laterality in *Xenopus*. *Current Biology* 17, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.067>
- Semina, E. V., Reiter, R., Leysens, N. J., Alward, W. L. M., Small, K. W., Datson, N. A., Murray, J. C., 1996. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, *RIEG*, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics*, 14, 392–399. <https://doi.org/10.1038/ng1296-392>
- Shook, D.R., Majer, C., Keller, R., 2004. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus*

- tropicalis*. Developmental Biology 270, 163–185.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.021>
- Smith, W.C., McKendry, R., Ribisi, S., Harland, R.M., 1995. A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer. *Cell* 82, 37–46.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90050-0)
- Soroldoni, D., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Czerny, T., 2007. Dynamic expression pattern of Nodal-related genes during left-right development in medaka. *Gene Expression Patterns* 7, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.05.013>
- Soukup, V., 2017. Left-right asymmetry specification in amphioxus: Review and prospects. *International Journal of Developmental Biology* 61, 611–620.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.170251vs>
- Soukup, V., Mrstakova, S., Kozmik, Z., 2018. Asymmetric *pitx2* expression in medaka epithalamus is regulated by nodal signaling through an intronic enhancer. *Development Genes and Evolution* 228, 131–139. <https://doi.org/10.1007/s00427-018-0611-1>
- Stubbs, J.L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J.C., Kintner, C., 2008. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nature Genetics*. 40, 1454–1460. <https://doi.org/10.1038/ng.267>
- Stundl, J., Soukup, V., Franěk, R., Pospisilova, A., Psutkova, V., Pšenička, M., Cerny, R., Bronner, M.E., Medeiros, D.M., Jandzik, D., 2022. Efficient CRISPR mutagenesis in sturgeon demonstrates its utility in large, slow-maturing vertebrates. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.750833>
- Supp, D.M., Witte, D.P., Steven Potter, S., Brueckner, M., 1997. Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice. *Nature* 389, 963–966.
<https://doi.org/10.1038/40140>
- Tabin, C. J., & Vogan, K. J., 2003. A two-cilia model for vertebrate left-right axis specification. *Genes & Development* 17, 1-6. <https://doi.org/10.1101/gad.1053803>
- Tadjuidje, E., Kofron, M., Mir, A., Wylie, C., Heasman, J., Cha, S.W., 2016. Nodal signalling in *Xenopus*: The role of Xnr5 in left/right asymmetry and heart development. *Open Biology* 6. <https://doi.org/10.1098/rsob.150187>
- Takahashi, S., Yokota, C., Takano, K., Tanegashima, K., Onuma, Y., Goto, J.I., Asashima,

- M., 2000. Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development* 127, 5319–5329. <https://doi.org/10.1242/dev.127.24.5319>
- Takeuchi, M., Takahashi, M., Okabe, M., Aizawa, S., 2009. Germ layer patterning in bichir and lamprey; an insight into its evolution in vertebrates. *Developmental Biology* 332, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.05.543>
- Tanaka, Y., Morozumi, A., & Hirokawa, N., 2023. Nodal flow transfers polycystin to determine mouse left-right asymmetry. *Developmental Cell* 58, 1447–1461. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.06.002>
- Tanaka, Y., Okada, Y., Hirokawa, N., 2005. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435, 172–177. <https://doi.org/10.1038/nature03494>
- Thisse, C., Thisse, B., 1999. Antivin, a novel and divergent member of the TGF β superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* 126, 229–240. <https://doi.org/10.1242/dev.126.2.229>
- Timmermans, L.P.M., 1987. Early development and differentiation in fish. *Sarsia* 72, 331–339. <https://doi.org/10.1080/00364827.1987.10419731>
- Tingler, M., Brugger, A., Feistel, K., Schweickert, A., 2022. *dmrt2* and *myf5* link early somitogenesis to left-right axis determination in *Xenopus laevis*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.858272>
- Tisler, M., Schweickert, A., Blum, M., 2017. *Xenopus*, an ideal model organism to study laterality in conjoined twins. *Genesis* 55, 1–6. <https://doi.org/10.1002/dvg.22993>
- Tisler, M., Wetzel, F., Mantino, S., Kremnyov, S., Thumberger, T., Schweickert, A., Blum, M., Vick, P., 2016. Cilia are required for asymmetric nodal induction in the sea urchin embryo. *BMC Developmental Biology* 16, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12861-016-0128-7>
- Tözser, J., Earwood, R., Kato, A., Brown, J., Tanaka, K., Didier, R., Megraw, T.L., Blum, M., Kato, Y., 2015. TGF- β signaling regulates the differentiation of motile cilia. *Cell Reports* 11, 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.025>
- Turing, A. M., 1952. The chemical basis of morphogenesis. *Bulletin of Mathematical Biology*

237, 37–72. <https://doi.org/10.1007/BF02459572>

Walentek, P., Schneider, I., Schweickert, A., Blum, M., 2013. Wnt11b Is Involved in cilia-mediated symmetry breakage during *Xenopus* left-right development. *PLoS One* 8, e73646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073646>

Warga, R.M., Kane, D.A., 2018. Wilson cell origin for Kupffer's vesicle in the zebrafish. *Developmental Dynamics* 247, 1057–1069. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24657>

Yang, X., Li, C., Xu, X., Deng, C., 1998. The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proceeding of National Academy of Sciences*. 95, 3667–3672. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3667>

Yoke, H., Taniguchi, A., Nonaka, S., 2023. Left-right asymmetry is formed in the basal bodies of the mouse node cilia in a cilia motility-dependent manner. *bioRxiv*, 2023–09. <https://doi.org/10.1101/2023.09.13.557556>

Yoshida, S., Shiratori, H., Kuo, I. Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., ... & Hamada, H., 2012. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science*, 338, 226–231. <https://doi.org/10.1126/science.1222538>

Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L.M., Kuehn, M.R., 1993. Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361, 543–547. <https://doi.org/10.1038/361543a0>