

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Martin Rulř

Vývoj levo-pravé asymetrie epithalamu u obratlovců

Development of left-right asymmetry of epithalamus in vertebrates

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze, dne 4. 8. 2024

Martin Rulf

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Mgr. Vladimíru Soukupovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky a trpělivost při psaní mé bakalářské práce.

Dále chci poděkovat své rodině za podporu během celé doby mého studia.

Abstrakt

Levo-pravá asymetrie epithalamu je rozšířena napříč druhy obratlovců a její podoba se vytváří během embryonálního vývoje. Asymetrie se týká nejen morfologie a rozdílné neuronální konektivity, ale i rozdílné exprese genů mezi levou a pravou stranou epithalamu. Vhodným modelovým druhem pro výzkum vývoje epithalamické asymetrie je ryba dánío (*Danio rerio*). U dánia se epithalamus skládá z levé a pravé habenuly obsahující rozdílně velká habenulární jádra a pineálního komplexu, který se skládá z pineálního a levostranného parapineálního orgánu. Tato asymetrie vzniká vzájemným ovlivňováním několika drah, například dráhy Nodal, a dále působením komponentů vznikajícího epithalamu a má vliv na správné vytvoření pozdějších struktur mozku. Výzkum tohoto procesu může přinést vhled do vzniků řady neurologických onemocnění a pomůže nám lépe pochopit průběh evolučního vývoje tohoto orgánu u obratlovců.

Klíčová slova

Levo-pravá asymetrie, epithalamus, Nodal dráha, habenula, pineální orgán, parapineální orgán

Abstract

Left-right asymmetry of epithalamus is widespread across vertebrate species and its form is established during embryonic development. The asymmetry involves not only morphology and differential neuronal connectivity, but also differential gene expression between the left and right sides of the epithalamus. A suitable model species for research on the development of epithalamic asymmetry is the zebrafish (*Danio rerio*). In zebrafish, the epithalamus consists of left and right habenulae containing differently sized habenular nuclei and a pineal complex consisting of a pineal and a left-sided parapineal organ. This asymmetry arises from the interaction of several pathways, such as the Nodal pathway, and the action of components of the nascent epithalamus, and affects the proper formation of later brain structures. Research of this process may provide insight into the origins of a number of neurological disorders and help in better understanding of the course of evolutionary history of this organ in vertebrates.

Key words

Left-right asymmetry, epithalamus, Nodal pathway, habenula, pineal organ, parapineal organ

Obsah

1. Úvod	1
2. Dráha Nodal.....	3
3. Levo-pravá asymetrie epithalamu.....	6
4. Ustanovení levo-pravé asymetrie epithalamu.....	9
4.1 Ustanovení levo-pravé asymetrie pineálního komplexu.....	9
4.2 Ustanovení levo-pravé asymetrie habenul.....	13
5. Asymetrie epithalamu v evolučním kontextu.....	15
5.1 Rozdíly v asymetrii epithalamu u paprskoploutvých ryb.....	15
5.2 Evoluční původ asymetrie epithalamu.....	17
6. Vliv asymetrie na chování.....	20
7. Závěr.....	22
8. Použitá literatura.....	24

1. Úvod

Asymetrie vnitřních orgánů je rozšířená napříč druhy obratlovců a představuje klíčovou podmínku pro správný chod fyziologických funkcí. Mezi orgány s asymetrií založenou na rozdílném levo-pravém uložení v těle nebo asymetrickou morfologií samotného orgánu můžeme zařadit například srdce, střeva ale i mozek. Mozkové hemisféry představují jeden z nejvýraznějších případů asymetrie mezi levou a pravou stranou těla (Schmitz et al., 2019).

Hemisférické lateralizace nabízejí výhody pro jedince, ale jsou prospěšné i v rámci populací, a proto jsou tedy velmi často zkoumaným fenoménem. Benefity lateralizace u jedince přináší zvýšení percepční nebo motorické schopnosti, které se vytváří během celoživotního tréninku jedné hemisféry, ve které bylo konkrétní centrum uloženo. Při preferenci jedné strany pro řešení určitého problému také dochází ke snížení doby, potřebné na zpracování podmětu a tím se zvyšuje reakční rychlost živočicha na situaci. Díky lateralizaci je také možné podměty zpracovávat paralelně v obou hemisférách zároveň a tím zvýšit kognitivní schopnost jedince (Güntürkün et al., 2020).

Pro správnou lateralizaci hemisfér je klíčové vytvoření levo-pravé asymetrie mozku během embryonálního vývoje. Jednou z nejlépe popsaných směrových asymetrií v mozku je asymetrie epithalamu. Pro tento výzkum je často využíván epithalamus malé tropické ryby dánío (*Danio rerio*), u kterého je asymetrie přítomná jak morfologicky, tak i molekulárně (Concha et al., 2009).

Epithalamus neovlivňuje chování živočichů jen prostřednictvím vývoje lateralizací hemisfér, ale sám se podílí na regulaci chování spojeného se strachovými situacemi, negativním učením a sociálními agresemi a jeho patologie mají vliv na vývoj řady onemocnění (Duboué et al., 2017; Chou et al., 2016).

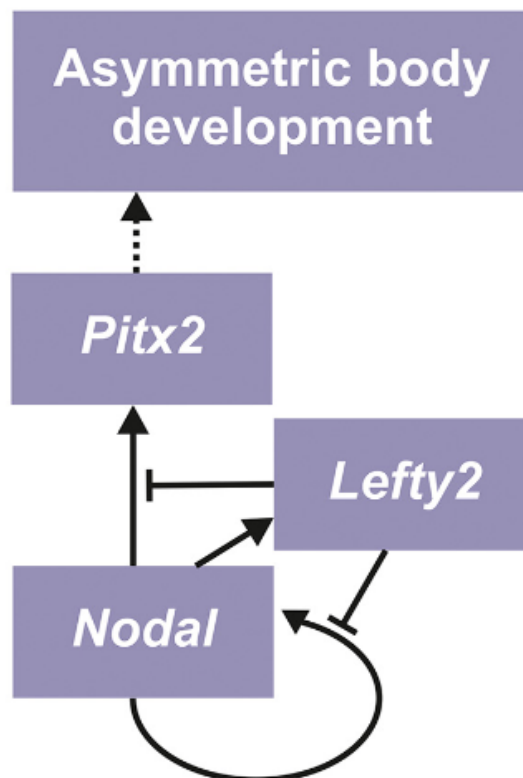
Proces vytváření anatomické asymetrie epithalamu je velmi dynamický a zahrnuje působení několika molekulárních drah, například Nodal dráhy, ale i vzájemné ovlivňování mezi jednotlivými vznikajícími strukturami epithalamu (Güntürkün et al., 2020). Ačkoli je asymetrie epitalamu rozšířená mezi druhy obratlovců, není její podoba jednotná a evoluční vznik není dosud přesně znám. Objasnění mechanismů vzniku asymetrie

pomůže nejen k lepšímu chápání průběhu vývoje a evoluce, ale také k pochopení vrozených vad a jiných genetických syndromů (Levin, 2005).

Cílem této bakalářské práce je popsat vývoj molekulární a anatomické asymetrie u modelového druhu dánío (*Danio rerio*) a srovnat tento proces s dalšími druhy obratlovců. Dále popsat samotnou anatomii epithalamu a vliv, který má na chování obratlovců.

2. Dráha Nodal

Asymetrie epithalamu je rozšířená v živočišné říši a vytváří se během ontogeneze asymetrickou expresí různých genů v rámci Nodal kaskády (Güntürkün et al., 2020). Tato kaskáda obsahuje tři hlavní komponenty: nodal, pitx2 a lefty (obrázek 1) (Nakamura & Hamada, 2012). Nodal, který patří do nadrodiny TGF β (Transforming Growth Factor β) (Long et al., 2003) je u dánia kódován třemi paralogy – Ndr1/squint, Ndr2/cyclops a Ndr3/southpaw (Feldman et al., 1998; Long et al., 2003; Soroldoni et al., 2007). Nodal pozitivně ovlivňuje Lefty, zatímco Lefty působí antagonisticky proti Nodal (Brent et al., 1999). Zároveň proti Nodal působí antagonisticky také Charon patřící do rodiny DAN/Cerberus a společně s Lefty ustanovuje asymetrický signál Nodal v laterální mezodermální ploténce (Hashimoto et al., 2004). Ptx2 je pak zodpovědný za ustanovení levo-pravé asymetrie jako takové (Campioni et al., 1999).



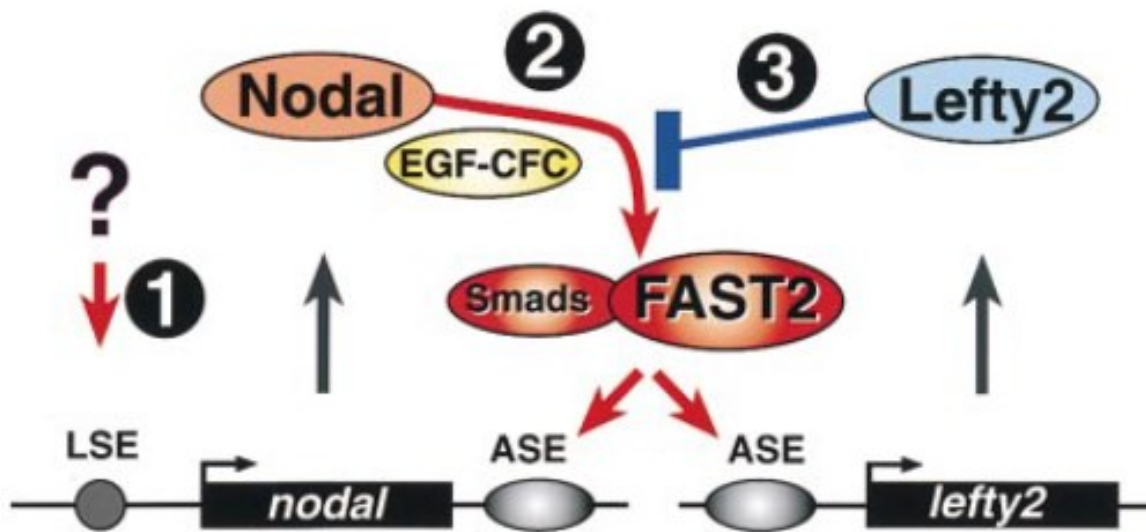
Obrázek 1 Zpětnovazebná smyčka regulující expresi genů nodal, lefty2 a pitx2. Nodal dokáže pozitivně ovlivňovat expresi genu lefty2 a sebe samého a dále pak také downstream genu pitx2, který způsobuje asymetrický vývoj orgánů. Lefty2 zároveň působí inhibičně proti expresi genu nodal a tím dokáže ovlivňovat i expresi genu pitx2 (převzato a upraveno podle Güntürkün et al., 2020).

Esenciální pro signalizaci Nodal během vývoje organismů jsou receptory ze skupiny EGF-CFC (Epidermal growth factor – Cripto1 FRL1 Cryptic). U dána se jedná o gen one-eyed pinhead (oep) a embrya s mutací v tomto genu vykazují defekty při vytváření laterální mezodermální ploténky a nereagují na nadměrnou expresi signálu Nodal (Gritsman et al., 1999).

U dána byla objevena skupina genů *antivin* (*atv*), která se velmi podobá skupině genů *lefty*, nalezených u jiných druhů (například myši), a proto bývají označovány stejně (Thisse & Thisse, 1999). *Lefty*, stejně jako *Nodal*, patří do nadrodiny TGF β (Transforming Growth Factor β) (Meno et al., 1996). U dána byly identifikovány dva geny *lefty*, a to *lefty1* (*lft1*) a *lefty2* (*lft2*) s odlišnými doménami exprese kolem antero-posteriorní osy, překrývající se s expresí genů *Ndr1/squint* a *Ndr2/cyclops* (Bisgrove et al., 1999).

Geny *lefty* (*antivin/atv*) působí inhibičně proti dráze *Nodal* prostřednictvím konkurence při vazbě na aktivinové receptory. U dána byl nalezen ortolog myšího aktivinového receptoru typu I (*ActRIB*), který byl pojmenován *activin A receptor typ 1Ba/ acvr1ba* (dříve označován jako *TARAM-A*) (Renucci et al., 1996).

Spolu s koreceptory EGF-CFC zprostředkovávají *Nodal* signalizaci aktivinové receptory, které zároveň působí jako serin-threoninové kinázy (Chen & Shen, 2004). Aktivinový receptor typu I (*ActRIB*) poté spolu s Aktivinovým receptorem typu II (*ActRIIB*) tvoří komplex (Attisano et al., 1992; Mathews & Vale, 1991) a společně následně fosforylují protein *Smad2* (Gu et al., 1998). Aktivovaný protein *Smad2* interaguje se *Smad4* a společně poté vstupují do jádra, kde aktivují transkripci genů *foxh1* (*FAST2*) a *mix.2* (*FAST1*) (Chen et al., 1996). Transkripční faktor *Mix.2* se podílí na indukci laterální mezodermální ploténky. *FoxH1* se podílí na indukci asymetrické exprese genů *nodal* a *lefty2* na levé straně laterální mezodermální ploténky a vytváření asymetrické signalizace tím, že se váže na konzervovanou sekvenci v levostranném specifickém enhanceru (ASE) pro geny *nodal* a *lefty2* (obrázek 2), ale také *pitx2*. (Saijoh et al., 2000).



Obrázek 2 Třístupňový model regulace asymetrické exprese genů *nodal* a *lefty2* u myši. 1, Počáteční exprese genu *nodal* je indukována zatím neznámou dráhou přes enhancer LSE (left side-specific enhancer). 2, Vzniklý protein Nodal poté indukuje expresi genu *lefty2* a také posiluje expresi genu *nodal* tím, že působí skrze proteinové komplexy Smads-FAST2 na levostraně specifické enhancery ASE přítomné v cis-regulačních oblastech obou genů. 3, Protein Lefty2 poté pomocí kompetice o aktivinové receptory (v obrázku nezobrazeno) a koreceptory EGF-CFC částečně inhibuje expresi genu *nodal* (převzato a upraveno podle Saijoh et al., 2000).

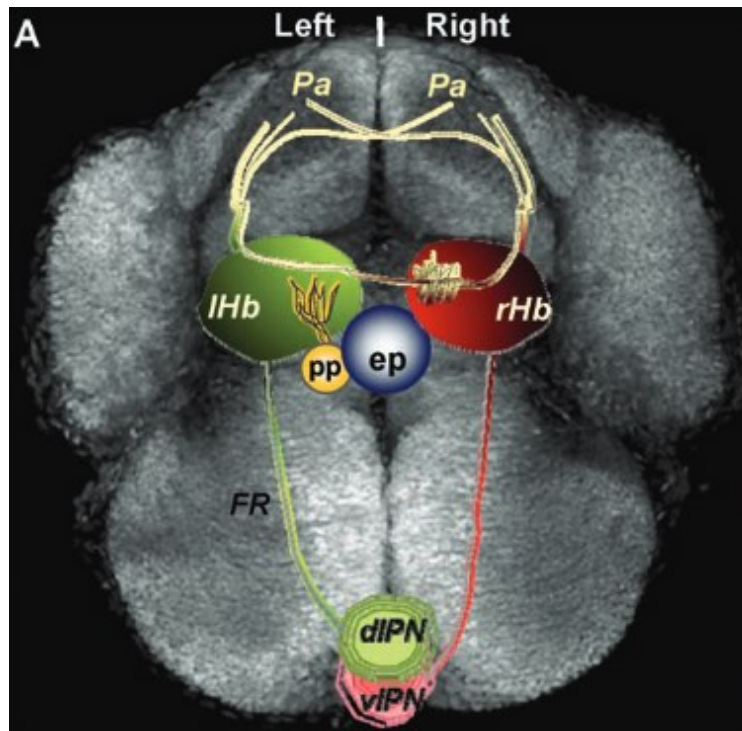
Expese genů *lefty2* a *Ndr2/cyclops* je také nezbytná pro expresi downstream genů, jako je například *pitx2* (Bisgrove et al., 1999). Gen *pitx2* kóduje transkripční faktor spadající do skupiny bicoid-related homeobox (Logan et al., 1998). Asymetricky se exprimuje v levé laterální mezodermální ploténce a je hlavním kandidátem pro vytvoření asymetrie v orgánech (Campioni et al., 1999). U dávnia se vyskytují dvě izoformy *pitx2*, a to *pitx2a* a *pitx2c*, s odlišnou expresí a funkcí. K expresi *pitx2c* dochází v levém dorzálním diencefalu a vyvíjejícím se střevě a *pitx2a* v levém srdečním primordiu. Ačkoli je *pitx2c* downstream genem od *nodal* a *lefty2*, dokáže ektopický *pitx2c* indukovat expresi genů *nodal* a *lefty2* (Essner et al., 2000).

3. Levo-pravá asymetrie epithalamu

Epithalamus je součástí diencefalonu a skládá se z levé a pravé habenuly a pineálního komplexu (Güntürkün et al., 2020). Habenuly tvoří součást systému dorzálního diencefalického vedení (DDC), které zpracovává signály z čichových a zrakových center v telencefalonu a převádí je do oblasti ventrálního tegmentálního jádra mesencefalonu. Dorzální diencefalické vedení je konzervováno napříč obratlovci (Bianco & Wilson, 2009; Fakhoury, 2018). Pineální komplex se skládá ze dvou fotorecepčních jader – mediálně umístěného pineálního orgánu a levostranného parapineálního orgánu. Na rozdíl od pineálního orgánu, který se nachází u všech obratlovců, se parapineální orgán vyskytuje jen u některých druhů ryb, obojživelníků a plazů (Concha & Wilson, 2001).

Epithalamus dánia (*Danio rerio*) představuje příklad nejlépe popsané směřové asymetrie mozku mezi obratlovci (Concha et al., 2009). Zároveň je neuroanatomická asymetrie dánia přítomná jak v habenulárních jádrech, tak pineálním komplexu, a proto zde bude popsán detailněji (obrázek 3) (Dadda et al., 2010).

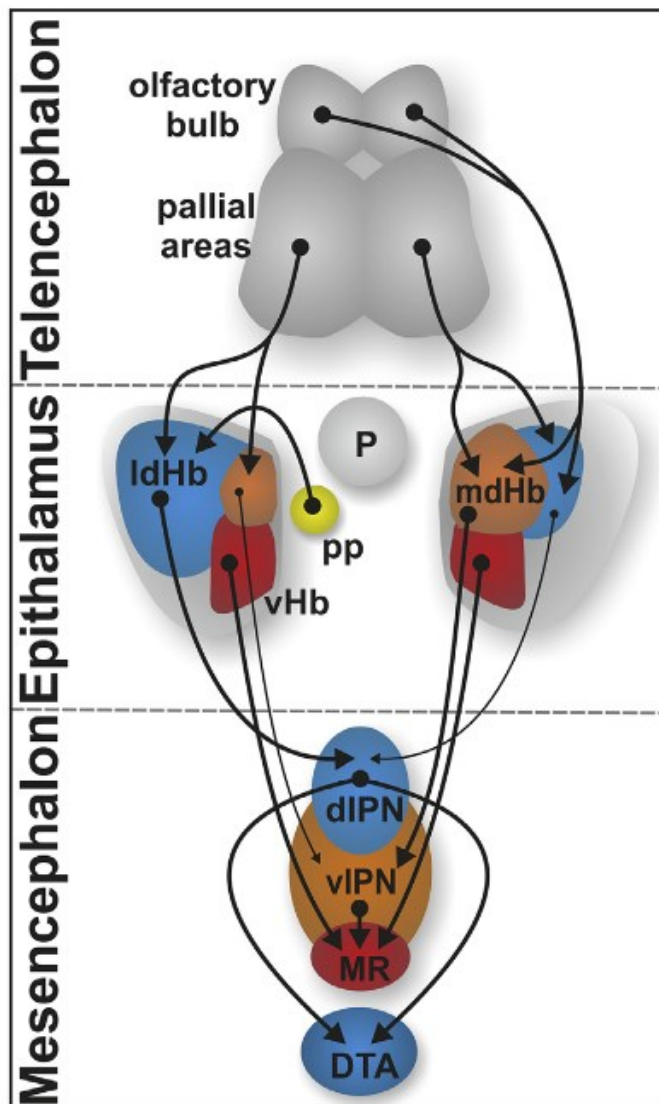
U paprskoploutvých ryb je pineální komplex tvořen z pineálního orgánu, který vzniká během embryonálního vývoje dříve než orgán parapineální a má posteriornější pozici (Hill, 1891). Během vývoje se ale do posteriornější pozice, která je u dánia s 90 % levostranná (Dadda et al., 2010), dostává migrací parapineální orgán (Holmgren, 1965). Neuronálně je tento komplex asymetricky napojen na levou habenulu (Concha et al., 2000).



Obrázek 3 Schématické znázornění epithalamu v mozku dva dny starého dáňá. Na mediálně uložený pineální orgán/epifýzu (ep) je napojen levostranný parapineální orgán (pp), inervující levé habenulární jádro (lHb). Neurony z olfaktorického bulbu (neoddělený od pallia) inervují pravé habenulární jádro (rHb) a obě habenulární jádra jsou současně inervována z pallia (Pa). Pravé habenulární jádro (rHb) je propojené s ventrálním interpedunkulárním jádrem (vIPN). Levé habenulární jádro (lHb) je propojeno pomocí fasciculu retroflexu (FR) s dorzálním interpedunkulárním jádrem (dIPN) (převzato a upraveno podle Roussigné et al., 2012).

Každá ze dvou asymetrických habenul, levá i pravá, se skládá ze tří jader. Z ventrálního, laterálního dorzálního a mediálního dorzálního jádra. Ventrální jádro je uloženo symetricky v obou habenulách. Zbylé dvě se však liší svou velikostí mezi levou a pravou habenulou. Laterální dorzální jádro je větší v levé habenule a mediální dorzální v pravé habenule (Aizawa et al., 2005; Hüsken & Carl, 2013). Habenuly jsou součástí systému propojujícího laterální dorzální habenulární jádro s dorzálním interpedunkulárním jádrem a mediální dorzální habenulární jádro s ventrálním interpedunkulárním jádrem (Bianco & Wilson, 2009). Dorzální interpedunkulární jádro dostává tedy vstupy převážně z levé habenuly, zatímco ventrální interpedunkulární jádro převážně z pravé habenuly (Aizawa et al., 2005). Různá jsou i místa, odkud přicházejí vstupy. Levá habenula je získává převážně z jednostranného fotosenzitivního parapineálního orgánu a ze specifické podskupiny gangliových buněk sítnice (Zhang et al., 2017). Pravá habenula získává vstupy

z čichového bulbu. Obě habenuly získávají také vstupy z pallia (obrázek 4) (Miyasaka et al., 2009).



Obrázek 4 Schématické znázornění epithalamu a asymetrického propojení s interpedunkulárním jádrem (IPN). Habenuly dánia získávají vstupy z pallia (pallial areas), zároveň pravá habenula získává vstupy z čichového bulbu (olfactory bulb) a levá habenula z parapineálního orgánu (pp). Dále se obě habenuly dělí na dorzální (dHb) a ventrální část habenuly (vHb), přičemž dorzální část habenuly je tvořena laterálními (ldHb) a mediálními (mdHb) habenulárními jádry nestejně velikosti. Ventrální habenulární jádro (vHb) je na obou stranách stejné. Dalšími složkami epithalamu dánia jsou fotosenzitivní pineální orgán/epifýza (P) a asymetricky uspořádaný parapineální orgán (PP). Laterální dorzální habenula (ldHb) a mediální dorzální habenula (mdHb) se promítají do dorzálního interpedunkulárního jádra (dIPN), resp. ventrálního interpedunkulárního jádra (vIPN). Dorzální a ventrální interpedunkulární jádro (IPN) se diferenciólně promítají do dorzální tegmentální oblasti (DTA), resp. do serotoninergního mediálního rafu (MR) (převzato a upraveno podle Güntürkün & Ocklenburg, 2017).

Vývoj habenulárních prekurzorů v asymetrických habenulárních jádrech postupuje od dorzální přes ventrolaterální do ventromediální části habenuly (5 dpf) (Aizawa et al., 2007) a prvotní neurogeneze se vytváří dříve v levé habenule než v pravé. Neurony vycházející z obou habenul mají na levé i pravé straně stereotypní, unipolární morfologii a v cílovém interpedunkulárním jádře vytvářejí specifické spirálovité zakončení. Rozdílné je však jejich axonální větvení. Oba typy se vyskytují v obou habenulách, ovšem s různou frekvencí (Bianco et al., 2008). Tuto specifičnost i asymetrii habenul ovlivňuje rozdílné načasování vývoje habenulárních jader (heterochronie) (Aizawa et al., 2007).

4. Ustanovení levo-pravé asymetrie epithalamu

U dána vykazuje epithalamus neuroanatomické a molekulární asymetrie, zahrnující rozdílné genové exprese, subnukleární regionalizace a načasování neuronální diferenciace (Roussigné et al., 2012). Tato asymetrie se vytváří postupně, vzájemnými interakcemi mezi levou presumptivní habenulou a migrujícím parapineálním orgánem (Concha et al., 2009) a ovlivňuje vznik funkčních asymetrií hemisfér (Güntürkün et al., 2020).

4.1 Ustanovení levo-pravé asymetrie pineálního komplexu

Asymetrii epithalamu předchází asymetrická exprese signální dráhy Nodal v laterální mezodermální ploténce, vytvořená na základě asymetrického signálu Nodal v organizátoru (Carl et al., 2007). Jak již bylo zmíněno dříve, geny *lefty1* a *lefty2* se exprimují v různých částech předozadní osy laterální mezodermální ploténky a prostorově a časově se překrývají s expresí *Ndr2/cyclops* a *Ndr1/squint* (Bisgrove et al., 1999). Inhibičním působením faktorů *lefty* proti Nodal ligandům dochází k ustanovení levostranného signálu v laterální mezodermální ploténce (Saijoh et al., 2000). Různé hladiny signálů *Ndr2/cyclops* a *Ndr1/squint*, působící na dálku jako morfogeny (Chen & Schier, 2001), mohou následně ovlivňovat expresi dalších genů. Takovým genem je například *pitx2*, který přenáší do vznikajících orgánů informaci o levostranné asymetrii (Campioni et al., 1999).

Ve vyvíjejícím se epithalamu jsou exprimovány geny Nodal dráhy, *tdgf1/oep* (One-eyed pinhead), *Ndr2/cyclops* a *foxb1/sur* (*schmalspur*) (24–26 s), které předchází vytvoření neuroanatomické asymetrie v této oblasti (Concha et al., 2000). Nodal dráha není

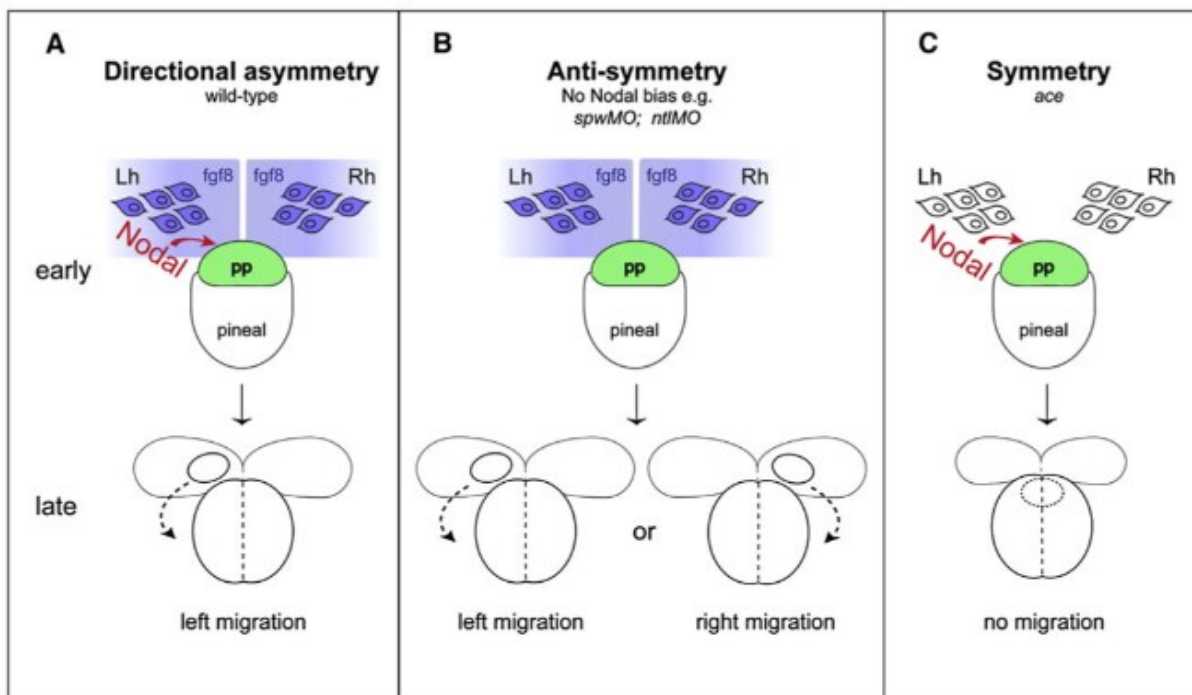
potřebná pro vytvoření laterality jako takové, ale závisí na ní směrová orientace. Působí prostřednictvím modulací drah, jako je například Fgf, a jejich downstream genů (Roussigné et al., 2012). První detekovaná asymetrie v mozku je exprese genu *Ndr2/cyclops* v oblasti budoucího levého epithalamu a tato exprese je následována expresí zpětnovazebného inhibitoru *lefty1* (20 hpf) (Bisgrove et al., 2000). Vývoj časné diencefalické levo-pravé asymetrie vyžaduje expresi také genu *Ndr3/southpaw*. Ten se ve stádiu 10–12 somitů levostranně exprimuje v laterální mezodermální ploténce, v mozku však přítomný není. Mutanti v tomto genu vykazují snížení levostranné exprese genů *Ndr3/cyclops*, *pitx2*, *lefty1*, a *lefty2* v laterální mezodermální ploténce (Long et al., 2003).

Podle autorů řídí Nodal signalizace asymetrii epithalamu tím způsobem, že určuje polohu pineálního komplexu, který se vynořuje ze střechy dorzálního diencefala. Podskupina buněk, nacházejících se na levé straně presumptivní pineálního komplexu exprimuje Nodal a jeho downstream geny (Liang et al., 2000). Faktory *Ndr2/cyclops*, *lefty1* a *pitx2* jsou exprimovány v levém epithalamu a zcela se překrývají. *Ndr2/cyclops* a *lefty1* jsou v celé doméně exprimovány rovnoměrně, zatímco *pitx2*, respektive jeho varianta *pitx2c*, se exprimuje silněji na laterálních okrajích domény (Bisgrove et al., 2000). Gen *pitx2c* je také, na rozdíl od *pitx2a*, během stádia 22–25 somitů exprimován v dorzálním diencefalu, oblasti, která odpovídá levé habenule (Essner et al., 2000). Zrušením funkce *pitx2c* morfolínovou strategií knockdown získává levá habenula charakter pravé a dochází ke zvýšení počtu parapineálních prekurzorů. Levo-pravý charakter habenul způsobuje antagonismus mezi aktivitami signálů Nodal a *Pitx2c*, který určuje množství parapineálních prekurzorů, což může být klíčové pro správné vytvoření levo-pravé asymetrie epithalamu (Garric et al., 2014).

Parapineální prekurzory jsou určeny v oblasti levého ventrálního epithalamu expresí homeoboxového genu *noto/flh* (floating head). Tento signál je nejprve detekován v anterior-dorzálním epithalamu, odkud buňky migrují. Tato migrace spolu s levostranným signálem Nodal vytváří levo-pravou asymetrii epithalamu (Concha et al., 2003). Parapineální prekurzory jsou poté uloženy jako shluk na mediálním a posteriorním okraji dorzální levé habenuly a udržují s ní spojení i v dospělosti (Palma et al., 2022). Poté, co dojde k delaminaci parapineálních prekurzorů z anteriorní části pineálního orgánu (26–28 hpf), jsou tyto buňky uspořádány do struktury podobné růžici (Roussigné et al., 2009).

Buňky nejprve migrují do leva (28-36 hpf), následně směrem k posterioru (36-48 hpf) a nakonec směrem ke středu (48-72 hpf) (Snelson, Burkart, et al., 2008). Tato migrace je poté nezbytná pro správné vytvoření epithalamické asymetrie jako takové (Concha et al., 2012).

Za směr migrace parapineálních prekurzorů je sice zodpovědná Nodal dráha, migraci jako takovou ale ovlivňuje bilaterálně exprimovaný růstový faktor Fgf8 (Fibroblast growth factor) (Concha et al., 2003). Pokud dojde k absenci Fgf8, je přítomnost Nodal signální dráhy randomizována už v laterální mezodermální ploténce a poté i v mozku (Albertson & Yelick, 2005). Je zajímavé, že signalizace Fgf může obrátit asymetrii mozku i nezávisle na normální asymetrii laterální mezodermální ploténky, protože může zabránit asymetrickému exprimování genů *Ndr3/southpaw* a *lefty2* (Neugebauer & Yost, 2014). Vlivy dráhy Fgf8 na migraci parapineálního orgánu byly experimentálně testovány. U embryí dáňia, ve kterých byla dráha Fgf farmakologicky blokována nedocházelo k zahájení migrace parapineálního orgánu a epithalamus zůstal symetrický. U *fgf8* mutantů *acerebellar^{ti282}/ace* se epithalamus také vytvářel symetricky, to však bylo možné zvrátit přidáním exogenního Fgf8 (obrázek 5–C), a v případě absence asymetrického signálu Nodal i ovlivnit směr migrace parapineálního orgánu (obrázek 5–B) směrem k přidanému jednostrannému signálu. K přirozené migraci na levou stranu docházelo pouze u embryí s přítomností obou signálů (obrázek 5–A). Fgf8, bilaterálně exprimovaný v habenuálních prekurzorových buňkách, je tedy při absenci dráhy Nodal dostatečný pro usměrnění laterality migrace (Regan et al., 2009).



Obrazek 5 Vývoj epithalamu dánia při absenci/presenci signálů Nodal a Fgf8. (A) Vývoj epithalamu wild-type embrya. Při presenci bilaterálního signálu Fgf8 a levostranného signálu Nodal migruje parapineální orgán vlevo. (B) Při absenci levostranného signálu Nodal a presenci bilaterálního signálu Fgf8 dochází k randomizaci migrace parapineálního orgánu. (C) Při absenci bilaterálního signálu Fgf8 a presenci levostranného signálu Nodal nedochází k migraci parapineálního orgánu, který zůstává v původní mediální pozici (převzato a upraveno podle Regan et al., 2009).

Jak již bylo zmíněno výše, osud buněk tvořících parapineální orgán ovlivňují růstové faktory ze skupiny Fgf8, které díky své chemotaktické schopnosti určují umístění a osud prekurzorů parapineálního orgánu (Snelson, Santhakumar, et al., 2008). Fgf8a se před začátkem migrace parapineálních prekurzorů (24 hpf) exprimuje na anterioru pineálního orgánu a absence jeho exprese má za následek změnu buněk na světločivné fotoreceptory. V parapineálních prekurzorech dochází k expresi receptoru pro Fgf8 FgfR4 (Regan et al., 2009) a transkripčního faktoru Tbx2b, které spolu s Fgf8 ovlivňují výsledné umístění parapineálního orgánu (Snelson, Santhakumar, et al., 2008).

Bylo navrženo, že parapineální orgán může fungovat jako přepínač, migrující z nestabilní střední linie do stabilnějších míst vlevo nebo vpravo, což následně určuje asymetrický vývoj přilehlé habenuly (Regan et al., 2009). Na stejné straně jako parapineální orgán se totiž vždy v habenulách vyskytuje silnější exprese genu *Kctd12-1/lov* (leftover) a v habenulách na opačné straně exprese genu *Kctd8/dex* (dexter) (Gamse et al., 2003).

Tuto teorii podporuje experiment, ve kterém byl zřetelný shluk parapineálních buněk rozeznán do stádia 28 hpf, ovšem exprese Kctd12-1/lov (leftover) byla detekována až (38–40 hpf). Laserová ablace parapineálního orgánu navíc vedla ke ztrátě specifické exprese Kctd12-1/lov v levé habenule (Regan et al., 2009). Všechny tyto experimenty naznačují, že vznik asymetrie parapineálního orgánu tedy předchází vzniku asymetrie mezi pravou a levou habenulou (Gamse et al., 2003).

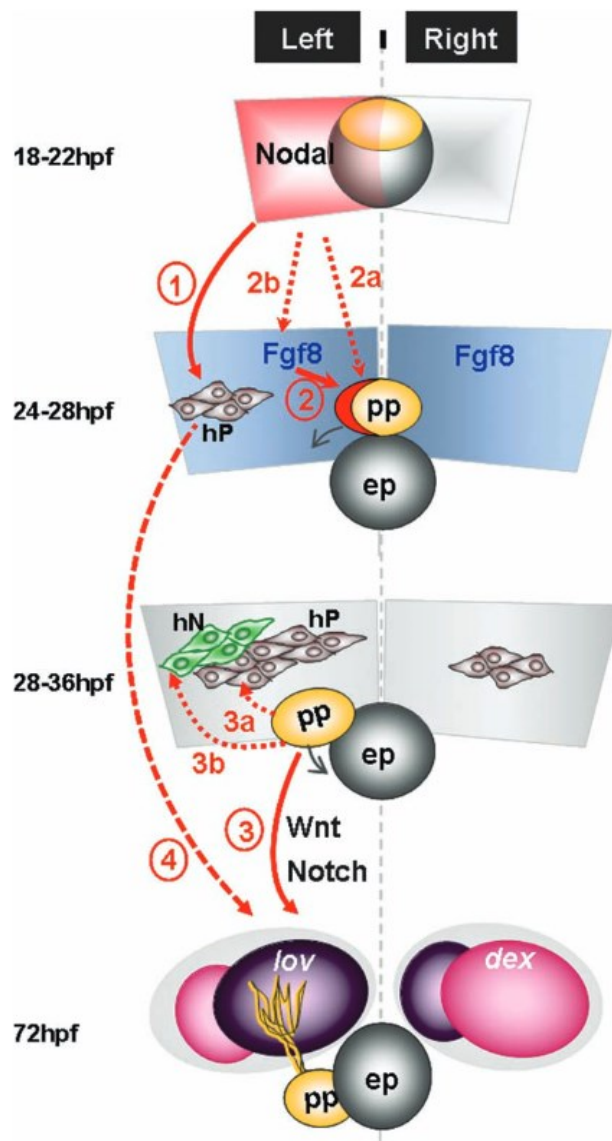
4.2 Ustanovení levo-pravé asymetrie habenul

Na vytváření levo-pravé asymetrie epithalamu dánia, a především habenul, se podílejí kromě drah Fgf8a, Nodal, i dráhy Notch, a Wnt/ β -catenin (Hüsken & Carl, 2013).

Dráha Notch je cílem signalizace Nodal v levé habenule (Aizawa et al., 2007) a pokud dojde k jejímu vážnému narušení (například mutací), vykazuje levá i pravá habenula stejný fenotyp. Naopak zisk dráhy Notch mezi 28. a 36. hpf má za následek dvojitou pravostrannou izomerii. Lokalizace a především síla signálu Notch je tedy nezbytná pro vytvoření identity levé i pravé habenuly (Aizawa et al., 2007).

Notch dráha je nezbytná také pro specifikaci projekčních neuronů oproti fotoreceptorům v pineálním komplexu, které pak svými vstupy do levé habenuly vytváří asymetrii mezi oběma habenulami (Cau et al., 2008).

Další signalizační drahou vytvářející asymetrii epithalamu je dráha Wnt/ β -Catenin (Carl et al., 2007; Roussigné et al., 2012), působící na vývoj svou proliferační schopností (Kioussi et al., 2002). Podobně jako dráha Notch je i dráha Wnt/ β -Catenin zapojená do vytváření projekčních neuronů mezi habenulami a parapineálním orgánem (Carl et al., 2007). Signalizace dráhy Wnt/ β -Catenin a její načasování je nezbytné pro specifikaci habenulárních neuronů, asymetrii a konektivitu axonů (Guglielmi et al., 2020). V pravé laterální habenule totiž podporuje identitu pravostranných neuronů. Naopak v levé je prostřednictvím dráhy Nodal potlačována a neurony získávají levostrannou identitu (Lanoizelet et al., 2023; Roussigné et al., 2012).



Obrázek 6 Model působení signálních drah na vývoj epithalamické asymetrie během embryonálního vývoje. Nodal řídí vývoj časně vzniklých habenulárních neuronů (1) a ty později mohou ovlivňovat výslednou habenulární asymetrii (4). Nodal zároveň v kooperaci s Fgf8 dává signál parapineálnímu orgánu (pp), aby migroval na levou stranu (2). Signalizace Wnt a Notch ovlivňuje specifitu a heterochronii vývoje habenulárních prekurzorů (hP) a habenulárních neuronů (hN). Tím vytváří asymetrii habenulárních jader. Na vytvoření charakteru levé habenuly (exprese *lov*) má vliv i projekce neuronů z asymetrického parapineálního jádra, které se do pravého jádra nepromítají (exprese *dex*) (3) (převzato a upraveno podle Roussigné et al., 2012).

Vývoj asymetrického epithalamu je tedy zprostředkován několika drahami. Jsou jimi dráha Nodal, Fgf8, Notch, a Wnt/ β -Catenin (Hüsken & Carl, 2013). Dráhy Nodal a Fgf8 jsou zodpovědné za správnou migraci parapineálního orgánu, kdy dráha Nodal určuje směr migrace a Fgf8 iniciuje migraci jako takovou. Pokud je jedna z těchto drah porušena,

dochází buď k randomizaci asymetrie a nebo vzniku symetrického epithalamu (Regan et al., 2009). Parapineální orgán poté ovlivňuje asymetrii habenuly, ke které je přikloněný. U wt embryí je to s 90 % pravděpodobností levá habenula (Dadda et al., 2010). Dráha Nodal dále ovlivňuje vytváření habenulárních neuronů pomocí modulací drah Notch a Wnt/ β -Catenin. Na levé straně vyvíjejícího se epithalamu jsou dráhy Notch a Wnt/ β -Catenin potlačovány působením dráhy Nodal a habenula tedy získává levou identitu. Na pravé straně jsou dráhy Notch a Wnt/ β -Catenin nepotlačeny a vytváří se habenula s pravostrannou identitou (obrázek 6) (Aizawa et al., 2007; Lanoizelet et al., 2023; Roussigné et al., 2012).

5. Asymetrie epithalamu v evolučním kontextu

5.1 Rozdíly v asymetrii epithalamu u paprskoploutvých ryb

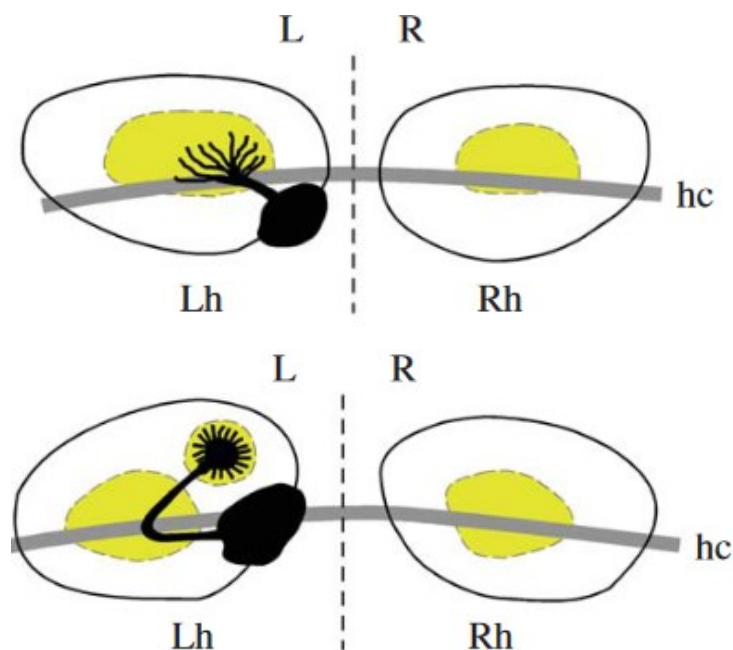
Asymetrie epithalamu je rozšířena mezi obratlovci a týká se velikostí jednotlivých habenul, neuronální organizace a konektivity. Tyto asymetrie jsou však mezi druhy variabilní (Concha & Wilson, 2001; Tabin, 2005).

Například fotoreceptivní parapineální orgán je propojen s levým habenulárním jádrem a u teleostních ryb je i situován v levé části mozku, ale toto propojení není vždy spojeno s rozdílnou velikostí habenulárních jader a neurální organizací u jiných druhů (Concha & Wilson, 2001).

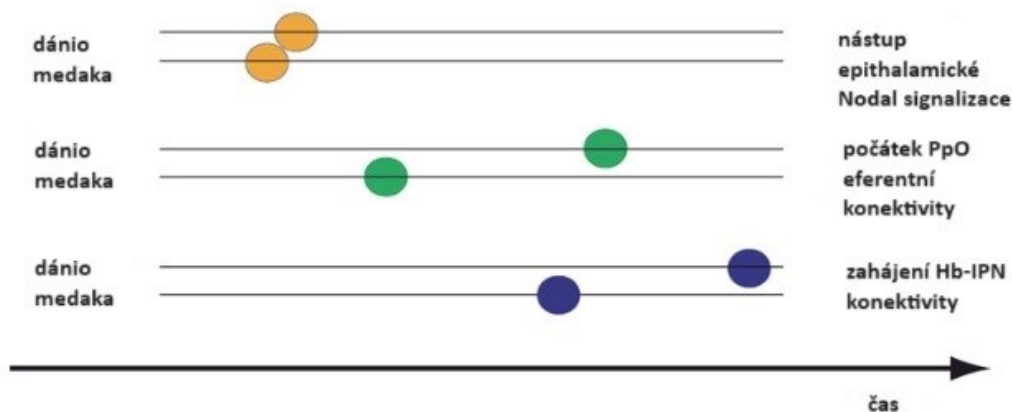
Signore et al. 2009 se zabývali srovnáním asymetrií epithalamu u dvou druhů Teleostei a to dania a medaky. Celková organizace mozkové asymetrie i časové uspořádání vývoje jsou u obou druhů konzervované. Rozdílný je však poměr velikostí pineálního a parapineálního orgánu. U dania představuje velikost parapineálního orgánu asi 10 % velikosti orgánu pineálního. U medaky však dosahuje velikosti až 60 % pineálního orgánu. Rozdílné je i propojení s habenulou, kdy u medaky většina parapineálních axonálních zakončení vytváří samostatnou dorzo-anteromediální doménu a tak explicitně přispívají k morfologické asymetrii habenuly (obrázek 7) (Signore et al., 2009).

K rozvoji epithalamické asymetrie tedy zřejmě dochází díky procesu heterochronie, která vzniká v důsledku různé sekvence, načasování a trvání vývojových procesů, a jednotlivé rozdíly mají vliv na morfologické odlišnosti mezi druhy (obrázek 8) (Signore & Concha,

2017). Hrubou asymetrii habenul vysvětlují dva typy zcela morfologicky odlišných typů neuronů, které vyrůstají z levé i pravé habenuly, ovšem na každé s jinou frekvencí a s jinou výslednou konektivitou. Oba typy habenulárních neuronů mají typickou unipolární morfologii, ale liší se ve způsobu axonálního větvení. Neurony vycházející z laterálního dorzálního habenulárního jádra v levé habenule inervují dorzální interpedunkulární jádro a neurony z mediálního dorzálního habenulárního jádra v pravé habenule inervují ventrální interpedunkulární jádro (Aizawa et al., 2005). Tento způsob vytváření habenulárních neuronů nejspíše vysvětluje nervové asymetrie na různých místech CNS u různých druhů obratlovců (Bianco et al., 2008). Výše popsany způsob vytváření habenulárních neuronů je dobře prozkoumán u modelového druhu dánío, shoduje se však s dalším teleostním druhem lososa atlantského. Rozdílem je levostranné pax6 pozitivní jádro, určující u lososa atlantského neuronální prekurzory, které však u dánía není zjistitelné, ale vyskytuje se u dalšího druhu, úhoře říčního. Toto srovnání naznačuje, že pax6 pozitivní jádro by mohlo být původní pro paprskoploutvé ryby (Michel et al., 2022).



Obrázek 7 Projekce parapineálních neuronů do levého habenulárního jádra u dánía (nahore) a medaky (dole), u které většina parapineálních axonálních zakončení vytváří samostatnou dorzo-anteromediální doménu (převzato a upraveno podle Signore et al., 2009).



Obrázek 8 Heterochronie pozorovaná u dvou druhů, dánia a medaky, PpO- parapineální orgán, Hb-habenula, IPN- interpedunkulární jádro (převzato a upraveno podle Signore & Concha, 2017).

5.2 Evoluční původ asymetrie epithalamu

Na rozdíl od parapineálního orgánu, který se vyskytuje jen u některých živočichů, je habenula evolučně konzervovaná epithalamická struktura přítomná u všech obratlovců. (Bianco & Wilson, 2009)

Bylo navrženo, že asymetrie epithalamu evolučně zřejmě vznikla ze symetrických habenul a mediálně uloženého pineálního a parapineálního orgánu. V průběhu evolučního vývoje epithalamu se objevil levostranný signál Nodal, který dal indukční signál habenule o směrové asymetrii. V dalším kroku se postupně vytvořily interakce mezi levou habenulou a parapineálním orgánem. Takováto interakce mohla vést parapineální orgán do vlivového pole Nodal signálu, který získal modulační vliv na symetrii a ovlivňováním časoprostorových aspektů ontogeneze přesunul parapineální orgán doleva. Tato asymetrie pak generovala nové typy genetických a tkáňových interakcí (Signore et al., 2016).

V tomto kontextu je nutné zmínit, že u zástupců časně se odvětvujících linií obratlovců, u mihule *Petromyzon marinus*, *Lampetra planeri* a žraloka *Scyliorhinus canicula*, jsou habenuly levo-pravě asymetrické (Concha & Wilson, 2001).

K morfologické asymetrii habenul u druhů mihule a žraloka ale dochází bez přítomnosti asymetrického parapineálního orgánu. U mihule je parapineální orgán uložen symetricky a u žraloka dokonce chybí úplně (Lagadec et al., 2015).

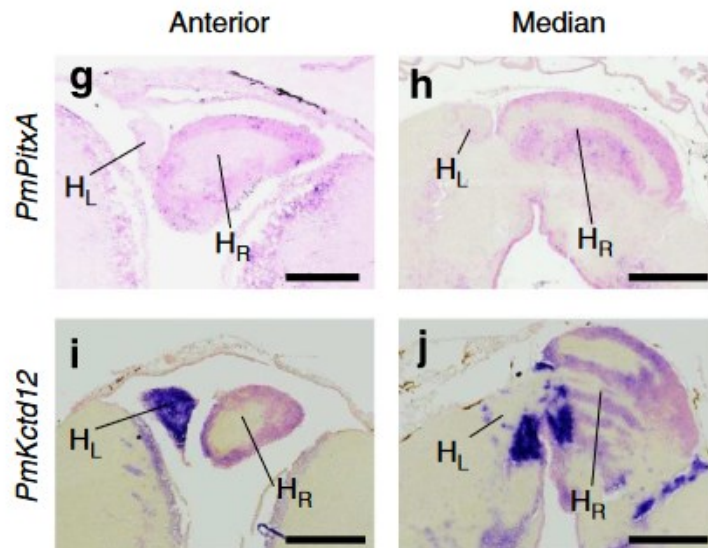
Je zajímavé, že u žraloka je výrazně větší levá habenula a u mihule zase ta pravá. I přes tento rozdíl je však signál Pitx2 ortologů, žraločího ScPitx2 (obrázek 10) a mihulího PmPitxA (obrázek 9), vždy levostranný. Na rozdíl od dánia jsou ale pitx2 ortology u žraloka a mihule exprimovány pouze během krátkého časového okna (Lagadec et al., 2015).

Jiné znaky zůstaly zachovány. Habenuly žraloka asymetricky exprimují ortolog genu lov dánia – ScKctd12a, ScKctd12b v levé habenule a ortolog genu dexter dánia – ScKctd8 v pravé habenule (obrázek 10), ovšem v habenulách dospělého žraloka jsou geny ScKctd12b a ScKctd8 exprimovány oboustranně. Dalšími markery habenul u žraloka je exprese ScSox1 v levé části laterální dorzální habenuly a exprese ScProx1 v pravé části laterální dorzální habenuly. Mediální dorzální habenula vykazuje exprese markerů ScPde1 a ScEnpp2. Ortology těchto genů lze opět nalézt v laterálním dorzálním i mediálním dorzálním habenulárním jádře dánia. Ortology genu lov dánia mihule PmKctd12 jsou v embryonálním stavu exprimovány v levé habenule (obrázek 9), u dospělého je ale tento signál také bilaterální (Lagadec et al., 2015; Lanoizelet et al., 2023).

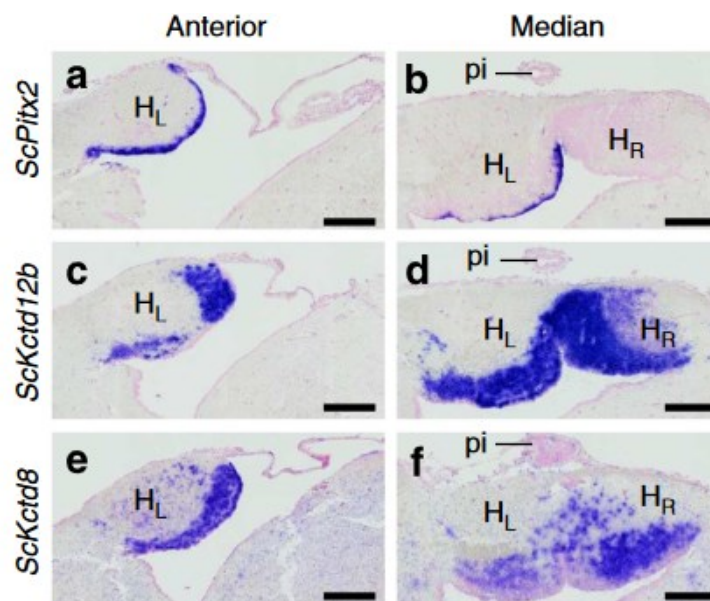
I přes tyto rozdíly jsou však habenulární asymetrie závislé na levostranné Nodal signalizaci, protože po inhibici této dráhy dochází k symetrizaci a pravé izomerii habenul (Lagadec et al., 2015).

Nodal řídí levo-pravou asymetrii epithalamu u žraloka i mihule přímo a zdá se tedy, že kooperace s Fgf8, která je nutná pro ustavení levo-pravé asymetrie epithalamu dánia, vzniká až později v evoluci zřejmě v linii vedoucí k paprskoploutvým rybám (Lagadec et al., 2015).

I tak jsou ale výsledky dosažené na žralokovi a mihuli v rozporu s předpokladem o původně symetrických habenulách (Signore et al., 2016) a tento evoluční scénář bude muset být revidován.



Obrázek 9 histologický řez epithalamem mihule s vyznačenou expresí proteinů. HL – levá habenula, HR – pravá habenula (převzato a upraveno podle Lagadec et al., 2015).



Obrázek 10 histologický preparát řezu epithalamem žraloka s vyznačenou expresí proteinů. HL – levá habenula, HR – pravá habenula, pi – pineální komplex (převzato a upraveno podle Lagadec et al., 2015).

Podobné rozmístění asymetrických markerů jako u žraloka lze nalézt například i u skupiny dvojdyšní. U tetrapodů byla ale tato podoba rozmístění markerů během vývoje ztracena (Lanoizelet et al., 2023).

Na základě exprese ortologů habenulárních markerů dánia a myši objevili Amo et al., 2010, že mediální a laterální habenula u myši odpovídá dorzální a ventrální habenule u

dánia (Lanoizelet et al., 2023). Zdá se ale, že levo-pravá asymetrie epithalamu myši, na rozdíl od dánia, není závislá na Nodal signalizaci (Güntürkün et al., 2020).

Původní myšlenka, že dráha Nodal byla při vytváření asymetrie epithalamu u tetrapodů ztracena (Lagadec et al., 2015), se díky recentním studiím ukazuje jako mylná. Exprese Nodal ligandu byla totiž objevena například v diencephalonu čolka (Ito et al., 2006), dále v habenulách želv *Pelodiscus sinensis* a *Trachemys scripta elegans*, které ale nevykazují asymetrii v rozdílné velikosti a parapineální orgán také chybí. U gekona *Paroedura picta* ale opět Nodal dráha v mozku nalezená nebyla. Přítomnost dráhy Nodal ve vyvíjejícím se mozku se tedy liší například i mezi různými druhy plazů (Kajikawa et al., 2022).

6. Vliv asymetrie na chování

Epithalamické asymetrické struktury jsou základem pro vznik asymetrických funkcí a mají jako takové vliv na chování jedinců v rámci druhu (Concha & Wilson, 2001). Zároveň připravují půdu pro pozdější složité interakce genetických, epigenetických a enviromentálních faktorů, které jsou prospěšné z hlediska zvyšování smyslové, kognitivní a motorické výkonnosti organismu (Güntürkün et al., 2020; Schmitz et al., 2019) a mají vliv na funkce spojené s přežíváním druhů, jako je krmení mláďat, detekce predátorů a paměť (Güntürkün et al., 2000; Pascual et al., 2004; Rogers, 2000). Chyby při vytvoření asymetrie habenul mají vliv na chování spojené s reakcemi na strach, úzkostmi a sociálními agresemi (Duboué et al., 2017; Chou et al., 2016). Zásadní roli v regulaci negativně motivovaného chování má laterální habenula. Ta přijímá vstupy z různých struktur předního mozku a bazálních ganglií a zaměřuje se v podstatě na všechny neuromodulační systémy středního mozku, včetně noradrenergního, serotoninergního a dopaminergního systému a její dysfunkce může mít vliv na vznik depresí (Hu et al., 2020), poruch nálad spojených s užíváním návykových látek (Fakhoury, 2018) a schizofrenií (Li et al., 2007).

Na asymetrii habenul u dánia závisí přijímání smyslových vjemů jako je čich a zrak (Facchin et al., 2015). Většina habenulárních neuronů, reagujících na světlo se nachází vlevo (Zhang et al., 2017) a na pach vpravo. Porucha této asymetrie vede ke ztrátě citlivosti na čichové anebo vizuální podměty (Dreosti et al., 2014). Dále změna směrovosti asymetrie snižuje míru průzkumného chování a zvyšuje hladinu kortizolu, což naznačuje

nárůst úzkosti (Facchin et al., 2015). Shluk neuronů nacházející se v pravé dHb zpracovává odpudivé čichové podmínky a moduluje výslednou behaviorální odpověď (Choi et al., 2021). A dysfunkce pravé dorzální habenuly (RdHb) negativně ovlivňuje aktivity spojené s hledáním potravy (Chen et al., 2019).

Dorzální habenulo-interpendunkulární dráha napomáhá k navrácení organismu do normálního stavu po vystavení neočekávanému negativnímu podmětu. Dánia se symetrickou, levo izomerizovanou dorzální habenulou po šoku rychle obnoví plavání, zatímco jedinci s pravostrannou izomerií zůstávají déle ve strnulém stavu (Duboué et al., 2017). Jedinci s pravostranným parapineálním orgánem se v prostředí s predátorem chovají odvážněji a tráví méně času v okrajových částech otevřeného pole (Dadda et al., 2010). A v rámci bojů mezi jedinci umlčování laterální nebo mediální dorzální habenuly ovlivňuje pravděpodobnost vítězství (Chou et al., 2016).

Randomizace epithalamických asymetrií prostřednictvím dráhy Nodal nemá vliv na reakce spojené s akustickými a vizuálními podmínkami, kinetikou pohybu a reaktivitou, objevují se však výrazné deficity při zahájení plavání a celkové vzdálenosti, kterou dánia urazila (Facchin et al., 2009).

7. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá vývojem levo-pravé asymetrie epithalamu u obratlovců, především pak vývojem u modelového organismu dánio (*Danio rerio*) a srovnáním tohoto procesu s vývojem asymetrií u dalších druhů. Dále pak vlivem asymetrie epithalamu na chování živočichů.

Asymetrii těla během embryonálního vývoje vytváří levostranný signál Nodal. Tento signál vzniká v útvaru zvaném organizátor a odtud se poté šíří do laterální mezodermální ploténky. Zde Nodal indukuje svou vlastní expresi a dále expresi genů *lefty1* a *pitx2*. Antagonistickým působením mezi Nodal a *Lefty1* dochází k levostrannému ustanovení dráhy Nodal a *Pitx2* poté ovlivňuje asymetrický vývoj orgánů.

Epithalamus dánia se skládá z levé a pravé habenuly a pineálního komplexu, který obsahuje pineální a parapineální orgán. Jakým přesným způsobem je signál Nodal přenášen do epithalamu není dosud objasněno, ale i zde určuje asymetrický vývoj. Za působení růstového faktoru *Fgf8* migruje parapineální orgán z mediální polohy směrem k signálu Nodal, který se nachází na levé straně epithalamu. Parapineální orgán poté vysílá neuronální zakončení do levé habenuly, ke které je přikloněn, a tím vytváří rozdíl mezi levou a pravou habenulou. Asymetrie epithalamu je dále vytvářena rozdílným vývojem habenulárních jader u levé a pravé habenuly. Tato jádra mají na každé straně jinou velikost a inervují rozdílná centra. Asymetrická jsou i místa, odkud přijímají vstupy. Habenulární asymetrie je vytvářena signálními drahami Notch a Wnt/ β -Catenin. Obě tyto dráhy jsou cílem levostranné signalizace Nodal a pomocí jejich asymetrického působení jsou vytvářeny dva morfologicky odlišné typy neuronů, které vytvářejí hrubou habenulární asymetrii. Správně vytvořená anatomická asymetrie má dále vliv na vytvoření lateralizovaného chování.

Ačkoli je asymetrie epithalamu velmi častá mezi druhy obratlovců, její podoba se mezi jednotlivými druhy liší. Například levostranný parapineální orgán, podílející se na vytváření asymetrie u dánia, není vůbec přítomný u žraloka a u mihule je umístěn symetricky. Asymetrie habenul je u těchto druhů vytvářena pouze působením dráhy Nodal. Ta zde tedy nemá pouze informační charakter o směru migrace jako u dánia, ale je

zodpovědná za asymetrii jako takovou. Dřívější teorie o ztrátě dráhy Nodal při vývoji epithalamu tetrapodů se také ukázala jako mylná. Tato dráha se totiž zřejmě vyskytuje i v mozku ocasatých obojživelníků a některých druhů želv.

Evoluční vývoj asymetrie epithalamu je tedy stále nejasný. Možné osvětlení této problematiky by mohl přinést výzkum vývoje asymetrie epithalamu u zástupců časně se odvětvujících linií obratlovců. Díky takovému výzkumu by bylo možné srovnat průběh evolučního vývoje asymetrie epithalamu obratlovců, a to především u linií vedoucím k paprskoploutvým rybám a tetrapodům, u kterých dochází k výrazným rozdílům tvorby asymetrie tohoto orgánu. Této problematice bych se rád věnoval během své diplomové práce, ve které bych se zabýval vývojem epithalamu u jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) coby zástupce časně se odvětvující linie paprskoploutvých ryb.

8. Použitá literatura

Aizawa, H., Bianco, I. H., Hamaoka, T., Miyashita, T., Uemura, O., Concha, M. L., Russell, C., Wilson, S. W., & Okamoto, H. (2005). Laterotopic representation of left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus. *Current Biology: CB*, 15(3), 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.014>

Aizawa, H., Goto, M., Sato, T., & Okamoto, H. (2007). Temporally regulated asymmetric neurogenesis causes left-right difference in the zebrafish habenular structures. *Developmental Cell*, 12(1), 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.004>

Albertson, R. C., & Yelick, P. C. (2005). Role *fgf8* signalizace v levo-pravém vzorování viscerálních orgánů a kraniofaciálního skeletu. *Developmental Biology*, 283(2), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.04.025>

Amo, R., Aizawa, H., Takahoko, M., Kobayashi, M., Takahashi, R., Aoki, T., & Okamoto, H. (2010). Identification of the Zebrafish Ventral Habenula As a Homolog of the Mammalian Lateral Habenula. *The Journal of Neuroscience*, 30(4), 1566–1574. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3690-09.2010>

Attisano, L., Wrana, J. L., Cheifetz, S., & Massagué, J. (1992). Novel activin receptors: Distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell*, 68(1), 97–108. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90209-u](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90209-u)

Bianco, I. H., Carl, M., Russell, C., Clarke, J. D., & Wilson, S. W. (2008). Brain asymmetry is encoded at the level of axon terminal morphology. *Neural Development*, 3(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-9>

Bianco, I. H., & Wilson, S. W. (2009). The habenular nuclei: A conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1519), 1005–1020. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0213>

Bisgrove, B. W., Essner, J. J., & Yost, H. J. (1999). Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling. *Development (Cambridge, England)*, 126(14), 3253–3262. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3253>

Bisgrove, B. W., Essner, J. J., & Yost, H. J. (2000). Multiple pathways in the midline regulate concordant brain, heart and gut left-right asymmetry. *Development (Cambridge, England)*, 127(16), 3567–3579. <https://doi.org/10.1242/dev.127.16.3567>

Brent, W. B., Jeffrey, J. E., & Joseph, Y. H. (1999). Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling. *Development*, 126(14), 3253–3262. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3253>

Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., Bebbber, F. van, 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(6), 1225–1234. <https://doi.org/10.1242/dev.126.6.1225>

Carl, M., Bianco, I. H., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Czerny, T., & Wilson, S. W. (2007). Wnt/Axin1/ β -Catenin Signaling Regulates Asymmetric Nodal Activation, Elaboration, and Concordance of CNS Asymmetries. *Neuron*, 55(3), 393–405. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.007>

Cau, E., Quillien, A., & Blader, P. (2008). Notch resolves mixed neural identities in the zebrafish epiphysis. *Development (Cambridge, England)*, 135(14), 2391–2401. <https://doi.org/10.1242/dev.013482>

Concha, M. L., Bianco, I. H., & Wilson, S. W. (2012). Encoding asymmetry within neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(12), 832–843. <https://doi.org/10.1038/nrn3371>

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(2), 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., Russell, C., Regan, J. C., Tawk, M., Sidi, S., Gilmour, D. T., Kapsimali, M., Sumoy, L., Goldstone, K., Amaya, E., Kimelman, D., Nicolson, T., Gründer, S., Gomperts, M., Clarke, J. D. W., & Wilson, S. W. (2003). Local Tissue Interactions across the Dorsal Midline of the Forebrain Establish CNS Laterality. *Neuron*, 39(3), 423–438. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00437-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00437-9)

Concha, M. L., Signore, I. A., & Colombo, A. (2009). Mechanisms of directional asymmetry in the zebrafish epithalamus. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(4), 498–509. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.11.007>

Concha, M. L., & Wilson, S. W. (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *Journal of Anatomy*, 199(1–2), 63–84. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19910063.x>

Dadda, M., Domenichini, A., Piffer, L., Argenton, F., & Bisazza, A. (2010). Early differences in epithalamic left-right asymmetry influence lateralization and personality of adult zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 206(2), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.019>

Dreosti, E., Vendrell Llopis, N., Carl, M., Yaksi, E., & Wilson, S. W. (2014). Left-right asymmetry is required for the habenulae to respond to both visual and olfactory stimuli. *Current Biology: CB*, 24(4), 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.016>

Duboué, E. R., Hong, E., Eldred, K. C., & Halpern, M. E. (2017). Left Habenular Activity Attenuates Fear Responses in Larval Zebrafish. *Current Biology: CB*, 27(14), 2154–2162.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.017>

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 (Cambridge, England)*, 127(5), 1081–1093. <https://doi.org/10.1242/dev.127.5.1081>

Facchin, L., Burgess, H. A., Siddiqi, M., Granato, M., & Halpern, M. E. (2009). Determining the function of zebrafish epithalamic asymmetry. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1519), 1021–1032. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0234>

Facchin, L., Duboué, E. R., & Halpern, M. E. (2015). Disruption of Epithalamic Left-Right Asymmetry Increases Anxiety in Zebrafish. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(48), 15847–15859. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2593-15.2015>

- Fakhoury, M. (2018). The dorsal diencephalic conduction system in reward processing: Spotlight on the anatomy and functions of the habenular complex. *Behavioural Brain Research, 348*, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.018>
- Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F., & Talbot, W. S. (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature, 395*(6698), 181–185. <https://doi.org/10.1038/26013>
- Gamse, J. T., Thisse, C., Thisse, B., & Halpern, M. E. (2003). The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. *Development (Cambridge, England), 130*(6), 1059–1068. <https://doi.org/10.1242/dev.00270>
- Garric, L., Ronsin, B., Roussigné, M., Booton, S., Gamse, J. T., Dufourcq, P., & Blader, P. (2014). Pitx2c ensures habenular asymmetry by restricting parapineal cell number. *Development (Cambridge, England), 141*(7), 1572–1579. <https://doi.org/10.1242/dev.100305>
- 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*(1), 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80720-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80720-5)
- Gu, Z., Nomura, M., Simpson, B. B., Lei, H., Feijen, A., van den Eijnden-van Raaij, J., Donahoe, P. K., & Li, E. (1998). The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. *Genes & Development, 12*(6), 844–857. <https://doi.org/10.1101/gad.12.6.844>
- Guglielmi, L., Bühler, A., Moro, E., Argenton, F., Poggi, L., & Carl, M. (2020). Temporal control of Wnt signaling is required for habenular neuron diversity and brain asymmetry. *Development, 147*(6), dev182865. <https://doi.org/10.1242/dev.182865>
- Güntürkün, O., Diekamp, B., Manns, M., Nottelmann, F., Prior, H., Schwarz, A., & Skiba, M. (2000). Asymmetry pays: Visual lateralization improves discrimination success in pigeons. *Current Biology: CB, 10*(17), 1079–1081. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00671-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00671-0)

- Güntürkün, O., & Ocklenburg, S. (2017). Ontogenesis of Lateralization. *Neuron*, *94*(2), 249–263. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.045>
- Güntürkün, O., Ströckens, F., & Ocklenburg, S. (2020). Brain Lateralization: A Comparative Perspective. *Physiological Reviews*, *100*(3), 1019–1063. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2019>
- 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 (Cambridge, England)*, *131*(8), 1741–1753. <https://doi.org/10.1242/dev.01070>
- Hill, C. (1891). Development of the epiphysis in *Coregonus albus*. *Journal of Morphology*, *5*(3), 503–510. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050050307>
- Holmgren, U. (1965). On the ontogeny of the pineal – and parapineal organs in teleost fishes. *Progress in Brain Research*, *10*, 172–182.
- Hu, H., Cui, Y., & Yang, Y. (2020). Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, *21*(5), 277–295. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0292-4>
- Hüsken, U., & Carl, M. (2013). The Wnt/ β -Catenin signaling pathway establishes neuroanatomical asymmetries and their laterality. *Mechanisms of Development*, *130*(6–8), 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.09.002>
- Chen, C., & Shen, M. M. (2004). Two modes by which Lefty proteins inhibit nodal signaling. *Current Biology: CB*, *14*(7), 618–624. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.042>
- Chen, W., Peng, X., Deng, Q., Chen, M., Du, J., & Zhang, B. (2019). Role of Olfactorily Responsive Neurons in the Right Dorsal Habenula–Ventral Interpeduncular Nucleus Pathway in Food-Seeking Behaviors of Larval Zebrafish. *Neuroscience*, *404*, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.057>

Chen, X., Rubock, M. J., & Whitman, M. (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature*, 383(6602), 691–696.

<https://doi.org/10.1038/383691a0>

Chen, Y., & Schier, A. F. (2001). The zebrafish Nodal signal Squint functions as a morphogen. *Nature*, 411(6837), 607–610. <https://doi.org/10.1038/35079121>

Choi, J. H., Duboue, E. R., Macurak, M., Chanchu, J.-M., & Halpern, M. E. (2021). Specialized neurons in the right habenula mediate response to aversive olfactory cues. *eLife*, 10, e72345. <https://doi.org/10.7554/eLife.72345>

Chou, M., Amo, R., Kinoshita, M., Cherng, B.-W., Shimazaki, H., Agetsuma, M., Shiraki, T., Aoki, T., Takahoko, M., Yamazaki, M., Higashijima, S., & Okamoto, H. (2016). Social conflict resolution regulated by two dorsal habenular subregions in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6281), 87–90. <https://doi.org/10.1126/science.aac9508>

Ito, Y., Oinuma, T., Takano, K., Komazaki, S., Obata, S., & Asashima, M. (2006). CyNodal, the Japanese newt nodal-related gene, is expressed in the left side of the lateral plate mesoderm and diencephalon. *Gene Expression Patterns: GEP*, 6(3), 294–298.

<https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.07.008>

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, 929808.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.929808>

Kioussi, C., Briata, P., Baek, S. H., Rose, D. W., Hamblet, N. S., Herman, T., Ohgi, K. A., Lin, C., Gleiberman, A., Wang, J., Brault, V., Ruiz-Lozano, P., Nguyen, H. D., Kemler, R., Glass, C. K., Wynshaw-Boris, A., & Rosenfeld, M. G. (2002). Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin—> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*, 111(5), 673–685. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01084-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01084-x)

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), 6686.

<https://doi.org/10.1038/ncomms7686>

Lanoizelet, M., Michel, L., Lagadec, R., Mayeur, H., Guichard, L., Logeux, V., Séverac, D., Martin, K., Klopp, C., Marcellini, S., Castillo, H., Pollet, N., Candal, E., Debiais-Thibaud, M., Boisvert, C., Billoud, B., Schubert, M., Blader, P., & Mazan, S. (2023). *Analysis of a shark reveals ancient, Wnt dependent, habenular asymmetries in jawed vertebrates* (s. 2023.10.17.562666). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.10.17.562666>

Levin, M. (2005). Left-right asymmetry in embryonic development: A comprehensive review. *Mechanisms of Development*, 122(1), 3–25.

<https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.08.006>

Li, X., Branch, C. A., Ardekani, B. A., Bertisch, H., Hicks, C., & DeLisi, L. E. (2007). fMRI study of language activation in schizophrenia, schizoaffective disorder and in individuals genetically at high risk. *Schizophrenia Research*, 96(1), 14–24.

<https://doi.org/10.1016/j.schres.2007.07.013>

Liang, J. O., Etheridge, A., Hantsoo, L., Rubinstein, A. L., Nowak, S. J., Izpisua Belmonte, J. C., & Halpern, M. E. (2000). Asymmetric nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ. *Development (Cambridge, England)*, 127(23), 5101–5112.

<https://doi.org/10.1242/dev.127.23.5101>

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(3), 307–317. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81474-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81474-9)

Long, S., Ahmad, N., & Rebagliati, M. (2003). The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development (Cambridge, England)*, 130(11), 2303–2316. <https://doi.org/10.1242/dev.00436>

Mathews, L. S., & Vale, W. W. (1991). Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell*, 65(6), 973–982.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90549-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90549-e)

- 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*(6578), 151–155. <https://doi.org/10.1038/381151a0>
- Michel, L., Palma, K., Cerda, M., Lagadec, R., Mayeur, H., Fuentès, M., Besseau, L., Martin, P., Magnanou, E., Blader, P., Concha, M. L., & Mazan, S. (2022). Diversification of habenular organization and asymmetries in teleosts: Insights from the Atlantic salmon and European eel. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.1015074>
- Miyasaka, N., Morimoto, K., Tsubokawa, T., Higashijima, S., Okamoto, H., & Yoshihara, Y. (2009). From the Olfactory Bulb to Higher Brain Centers: Genetic Visualization of Secondary Olfactory Pathways in Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, *29*(15), 4756–4767. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0118-09.2009>
- Nakamura, T., & Hamada, H. (2012). Left-right patterning: Conserved and divergent mechanisms. *Development (Cambridge, England)*, *139*(18), 3257–3262. <https://doi.org/10.1242/dev.061606>
- Neugebauer, J. M., & Yost, H. J. (2014). FGF signaling is required for brain left–right asymmetry and brain midline formation. *Developmental Biology*, *386*(1), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.11.020>
- 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*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.999265>
- Pascual, A., Huang, K.-L., Neveu, J., & Préat, T. (2004). Neuroanatomy: Brain asymmetry and long-term memory. *Nature*, *427*(6975), 605–606. <https://doi.org/10.1038/427605a>
- 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*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.030>
- Renucci, A., Lemarchandel, V., & Rosa, F. (1996). An activated form of type I serine/threonine kinase receptor TARAM-A reveals a specific signalling pathway involved

in fish head organiser formation. *Development (Cambridge, England)*, 122(12), 3735–3743. <https://doi.org/10.1242/dev.122.12.3735>

Rogers, L. J. (2000). Evolution of hemispheric specialization: Advantages and disadvantages. *Brain and Language*, 73(2), 236–253. <https://doi.org/10.1006/brln.2000.2305>

Roussigné, M., Bianco, I. H., Wilson, S. W., & Blader, P. (2009). Nodal signalling imposes left-right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei. *Development (Cambridge, England)*, 136(9), 1549–1557. <https://doi.org/10.1242/dev.034793>

Roussigné, M., Blader, P., & Wilson, S. W. (2012). Breaking symmetry: The zebrafish as a model for understanding left-right asymmetry in the developing brain. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 269–281. <https://doi.org/10.1002/dneu.20885>

Saijoh, Y., Adachi, H., Sakuma, R., Yeo, C. Y., Yashiro, K., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Kawabata, M., Miyazono, K., Whitman, M., & Hamada, H. (2000). Left-right asymmetric expression of *lefty2* and *nodal* is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor *FAST2*. *Molecular Cell*, 5(1), 35–47. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80401-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80401-3)

Schmitz, J., Güntürkün, O., & Ocklenburg, S. (2019). Building an Asymmetrical Brain: The Molecular Perspective. *Frontiers in Psychology*, 10, 982. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00982>

Signore, I. A., & Concha, M. L. (2017). Heterochrony and Morphological Variation of Epithalamic Asymmetry. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 328(1–2), 157–164. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22698>

Signore, I. A., Guerrero, N., Loosli, F., Colombo, A., Villalón, A., Wittbrodt, J., & Concha, M. L. (2009). Zebrafish and medaka: Model organisms for a comparative developmental approach of brain asymmetry. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1519), 991–1003. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0260>

Signore, I. A., Palma, K., & Concha, M. L. (2016). Nodal signalling and asymmetry of the nervous system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1710), 20150401. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0401>

Snelson, C. D., Burkart, J. T., & Gamse, J. T. (2008). Formation of the Asymmetric Pineal Complex in Zebrafish Requires Two Independently Acting Transcription Factors.

Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, 237(12), 3538–3544. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21607>

Snelson, C. D., Santhakumar, K., Halpern, M. E., & Gamse, J. T. (2008). Tbx2b is required for the development of the parapineal organ. *Development (Cambridge, England)*, 135(9), 1693–1702. <https://doi.org/10.1242/dev.016576>

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(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.05.013>

Tabin, C. (2005). Do we know anything about how left-right asymmetry is first established in the vertebrate embryo? *Journal of Molecular Histology*, 36(5), 317–323. <https://doi.org/10.1007/s10735-005-9000-y>

Thisse, C., & Thisse, B. (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGF β superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development*, 126(2), 229–240. <https://doi.org/10.1242/dev.126.2.229>

Zhang, B. B., Yao, Y. Y., Zhang, H. F., Kawakami, K., & Du, J. L. (2017). Left Habenula Mediates Light-Preference Behavior in Zebrafish via an Asymmetrical Visual Pathway. *Neuron*, 93(4), 914-928.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.011>