

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Jan Vintr

Role kyseliny retinové ve vývoji faryngeálního aparátu axolotla

Role of retinoic acid in the development of pharyngeal apparatus of axolotl

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.

Praha, 2024

Abstrakt

Faryngeální oblouky jsou jedním ze základních stavebních prvků tělního plánu obratlovců. Axolotl mexický je vhodným organismem pro studium faryngeální segmentace, protože jednotlivé faryngeální oblouky se liší z hlediska stavby hyobranchiálního skeletu a přítomnosti vnějších žaber. Cílem této práce je zjistit, zdali v určení segmentární identity faryngových oblouků hraje signalizace kyseliny retinové podobnou roli jako v případě dalších dvou segmentárních systémů obratlovců: trupových somitů a rombencefala. V rámci této práce bylo dosaženo výsledků v podobě homeotických transformací segmentů faryngeálního aparátu následkem inhibice receptorů kyseliny retinové (RAR). Inhibice receptorů kyseliny retinové způsobuje vývoj ektopické vnější žábry na čtvrtém branchiálním oblouku, který je doprovázen vznikem ektopických elementů hypobranchiale 3, hypobranchiale 4 a ceratobranchiale 5. Na základě těchto výsledků je oprávněné tvrdit, že gradient koncentrace kyseliny retinové je mechanismem, který, přinejmenším u ocasatých obojživelníků určuje anteroposteriorní identitu faryngeálních segmentů. Výsledky této práce také poskytují možné proximální vysvětlení pro mezidruhovou a vnitrodruhovou variabilitu ve stavbě hyobranchiálního skeletu a v počtu vnějších žaber obojživelníků.

Klíčová slova: axolotl, vnější žábry, farynx, hyobranchiální skelet, kyselina retinová

Abstract

Pharyngeal arches are among the main structural features of vertebrate body plan. The Mexican axolotl is a useful organism for the study of pharyngeal segmentation since individual pharyngeal arches differ in terms of presence of external gills and the composition of hyobranchial skeleton. The aim of this thesis is to determine if retinoic acid plays a similar role in specification of vertebrate pharyngeal segment identity as in the case of two other vertebrate segmented systems: trunk somites and hindbrain. This work achieved results in the form of homeotic transformations affecting the pharyngeal apparatus as a consequence of inhibition of retinoic acid receptors (RAR). Inhibition of retinoic acid receptors causes the development of an ectopic external gill on the fourth branchial arch which is accompanied by the presence of ectopic elements hypobranchial 3, hypobranchial 4, and ceratobranchial 5. On the basis of these result, it is justified to state that retinoic acid gradient is a mechanism that determines the anteroposterior identity of pharyngeal segments. The results of this thesis also provide a potential proximate explanation of interspecific a intraspecific variation in terms of the composition of hyobranchial skeleton and the number of external gills in amphibians.

Keywords: axolotl, external gills, pharynx, hyobranchial skeleton, retinoic acid

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat mému vedoucímu práce Vladimíru Soukupovi za vedení této práce a za předávání zkušeností se zde použitými metodami. Dále bych chtěl poděkovat Ann Huyseunne a Robertu Černému za konzultaci. Grantové agentuře Univerzity Karlovy děkuji za materiální podporu v rámci projektu GAUK č. 35502 a Laboratoři elektronové mikroskopie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za poskytnutí možnosti využívat skenovací elektronový mikroskop.

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

V Praze, 7.8.2024

Bc. Jan Vintř

Obsah

1 Úvod	10
1.1 Segmentace těla obratlovců	10
1.1.1 Rombencefalon	10
1.1.2 Segmentace trupu	13
1.1.3 Farynx	14
1.1.3.1 Hyobranchiální skelet	18
1.1.3.2 Vnější žábry	24
1.2 Kyselina retinová v embryonálním vývoji obratlovců	26
1.2.1 Metabolismus a signalizace kyseliny retinové	26
1.2.2 Funkce kyseliny retinové v segmentaci rombencefala	28
1.2.3 Homeotické transformace faryngového aparátu	29
1.2.3.1 Geny <i>Hox</i>	29
1.2.3.2 Homotoické transformace spojené s kyselinou retinovou	33
1.2.4 Funkce kyseliny retinové při vývoji párových končetin a ploutví	34
1.3 Shrnutí úvodu a cíle práce	35
2 Materiály a metody	36
2.1 Embryonální materiál	36
2.2 Analýza genové exprese	36
2.2.1 Příprava prób na ISH	36
2.2.1.1 <i>Cyp26b</i>	36
2.2.1.2 <i>Rarβ</i>	37
2.2.1.3 <i>Raldh2</i>	37
2.2.2 In situ hybridizace	37
2.3 Chemická inhibice receptorů kyseliny retinové	38
2.3.1 Příprava roztoků inhibitorů	38
2.4 Imunohistochemie	39
2.5 Elektronová mikroskopie	39
2.6 Barvení skeletu alciánovou modří	39
3 Výsledky	40
3.1 Exprese genů pro metabolismus kyseliny retinové	40
3.1.1 <i>Raldh2</i>	40

3.1.2	<i>Cyp26b</i>	40
3.1.3	<i>Rarβ</i>	41
3.2	Chemická inhibice receptorů kyseliny retinové	41
3.2.1	Efekt na vnější žábry	41
3.2.2	Protilátkové barvení struktur ve vnějších žábrách	44
3.2.3	Barvení hyobranchiálního skeletu alciánovou modří	45
4	Obrazové tabule	48
4.1	Analýza genové exprese	48
4.1.1	<i>Raldh2</i>	48
4.1.2	<i>Cyp26b</i>	56
4.1.3	<i>Rarβ</i>	64
4.2	Chemická inhibice receptorů kyseliny retinové	66
4.2.1	Celkový fenotyp	66
4.2.2	Hyobranchiální skelet	108
4.3	Imunohistochemie struktur v indukovaných žábrách	126
4.3.1	Imunohistochemie svalů v indukovaných žábrách	126
4.3.2	Imunohistochemie nervů v indukovaných žábrách	128
5	Diskuse	130
5.1	Inhibice RAR vede k indukci ektopických orgánů	130
5.2	Iniciace vnějších žaber vyžaduje inhibici kyseliny retinové	131
5.3	Po inhibici RAR dochází k homeotické transformaci faryngových oblouků	132
5.4	Indukované struktury korespondují se znaky jiných skupin obratlovců	133
5.4.1	Neontologické souvislosti	133
5.4.2	Paleontologické souvislosti	136
5.5	Ve vývoji vnějších žaber funguje kyselina retinová ve dvou fázích	137
6	Závěr	138

Seznam obrazových tabulí

1	In situ hybridizace genu <i>Raldh2</i> v mladších stádiích (1. část)	49
2	In situ hybridizace genu <i>Raldh2</i> v mladších stádiích (2. část)	51
3	In situ hybridizace genu <i>Raldh2</i> ve starších stádiích	53
4	In situ hybridizace genu <i>Raldh2</i> ve filamentech	55
5	In situ hybridizace <i>Cyp26b</i> (1. část)	57
6	In situ hybridizace <i>Cyp26b</i> (2. část)	59
7	In situ hybridizace <i>Cyp26b</i> (3. část)	61
8	In situ hybridizace <i>Cyp26b</i> (SEM)	63
9	In situ hybridizace <i>Rarβ</i>	65
10	Experiment 1	67
11	Experiment 2 (1. část)	69
12	Experiment 2 (2. část)	71
13	Experiment 3 (1. část)	73
14	Experiment 3 (2. část)	75
15	Experiment 4 (1. část)	77
16	Experiment 4 (2. část)	79
17	Experiment 5 (1. část)	81
18	Experiment 5 (2. část)	83
19	Experiment 5 (3. část)	85
20	Experiment 6 (SEM)	87
21	Experiment 7, korelace ISH <i>Cyp26b</i> a SEM	89
22	Experiment 6, exprese <i>Raldh2</i> v indukovaných žábřách	91
23	Experiment 8, kontrola, 3 dny graf	93
24	Experiment 8, 12 dnů	95
25	Experiment 8, 12 dnů (SEM)	97
26	Experiment 8, 4 dny (SEM)	99
27	Experiment 8, 4 dny (SEM)	101
28	Experiment 8, 3 dny (SEM)	103
29	Experiment 8, 3 dny	105
30	Experiment 9	107
31	Experiment 8, kontrola, 4 dny, skelet	109
32	Experiment 8, 4 dny, skelet	111

33	Experiment 8, 5 a 6 dnů, skelet	113
34	Experiment 8, 6 dnů, skelet	115
35	Experiment 8, 12 dnů, skelet	117
36	Experiment 3, skelet	119
37	Experiment 4, skelet (1 . část)	121
38	Experiment 4, skelet (2 . část)	123
39	Experiment 4, skelet (3 . část)	125
40	Experiment 5, protilátka 12/101	127
41	Experiment 7, protilátka anti-myelin	129

1 Úvod

1.1 Segmentace těla obratlovců

Segmentace je mimořádně úspěšný princip uspořádání tělního plánu živočichů spočívající v repetici stavebních jednotek anteroposteriorní osy organismu, které zároveň samy vykazují anteroposteriorní polaritu (Hannibal & Patel, 2013). Jednotlivé jednotky, případně jejich větší celky, přitom mohou získávat unikátní funkční a morfologické charakteristiky. Podle celkového počtu druhů i podílu na globální biomase (Bar-On et al., 2018) jsou zdaleka největšími živočišnými kmeny členovci a strunatci, jejichž tělní plány jsou postaveny právě na segmentárním principu. Tělní plán obratlovců se vyznačuje segmentárním uspořádáním zvláště během embryonálního vývoje. Na těle všech obratlovců se vždy přinejmenším po určitou dobu během ontogeneze projevuje segmentace na několika úrovních, čímž se obratlovci liší od členovců, jejichž celý organismus tvoří jediný segmentární systém. U obratlovců totiž segmentární členění vykazuje rombencefalón, trupové somity a farynx (kapitola 1.1.3). Segmentace se tudíž projevuje na strukturách vznikajících ze všech zárodečných vrstev, protože rombencefalón je ektodermální, somity mesodermální a farynx je primárně entodermální. Mechanismy vzniku morfologické a funkční specializace stavebních jednotek všech tří systémů jsou v mnohém odlišné, ale sdílejí jisté společné rysy v podobě některých signálních drah, které určují jejich orientaci podle tělních os a v podobě aktivity některých transkripčních faktorů. Jednotlivé segmentární systémy se také vzájemně ovlivňují tím způsobem, že struktura jednoho může být určována strukturou druhého. Přestože byl učiněn určitý pokrok v poznání regulace vzniku těchto systémů, není doposud v konkrétních detailech dobře známé, jaké faktory a procesy přesně podmiňují identitu jednotlivých segmentů a jaké jsou příčiny jejich transformací během ontogeneze a fylogeneze. Zvláště ve znalostech o segmentaci a určení identity a funkční diferenciaci faryngeálních segmentů jsou značné mezery, ačkoli se jedná o jeden z hlavních a možná o vůbec nejdůležitější znak definující kmen strunatců.

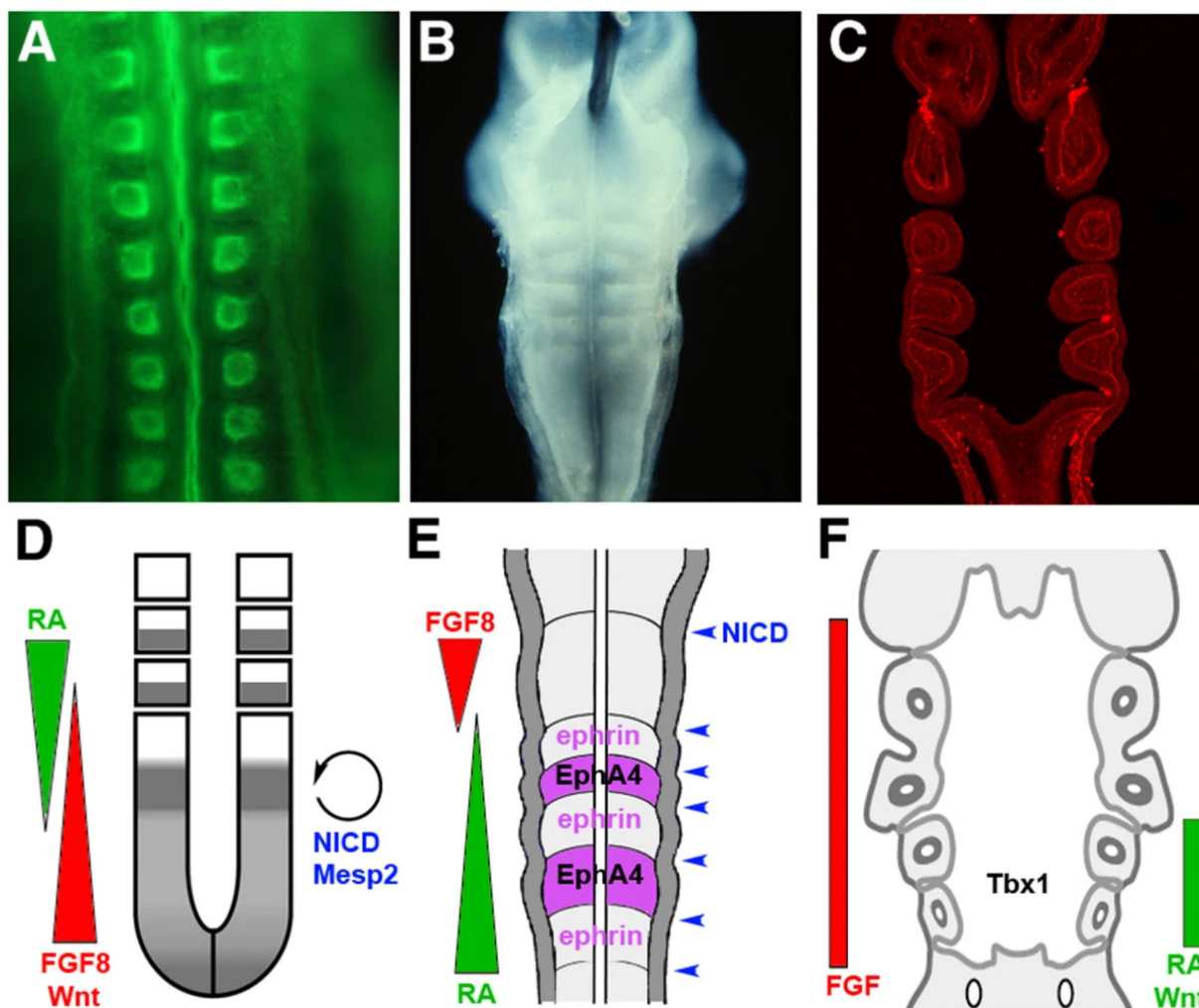
1.1.1 Rombencefalón

Rombencefalón je přechodně existující segmentovaný embryonální orgán obratlovců, z něhož později vzniká prodloužená mícha (myelencefalón), metencefalón a některé z hlavových nervů. Segmentace rombencefala je apomorfií obratlovců, a tudíž se vyskytuje pouze u živočichů s pravou neurální lištou, s níž úzce souvisí, protože je zároveň zdrojem

buněk hlavové neurální lišty migrující do faryngových oblouků. Rombencefalon vzniká tím způsobem, že během embryonálního vývoje dochází k rozdělení epiteliální trubice rombencefalického primordia na segmenty známé jako rombomery, jejichž počet je mezi obratlovci ustálený na sedmi nebo osmi. Tyto segmenty nejsou rozlišené morfologicky, ale odlišují se z hlediska exprese genů a především z hlediska funkce v souvislosti s migrací neurální lišty. Rombomery se označují jako r1-r8, přičemž r1 je nejvíce anteriorní. Rombencefalon se někdy funkčně dělí na anteriorní, preotickou, a posteriorní, postotickou, polovinu (Glover et al., 2006). Jako preotické jsou označovány rombomery r1-r4, kdežto jako postotické jsou označovány rombomery nacházející se posteriorně od rombomery 4, která je na stejné úrovni jako otické (sluchové) pouzdro (Minoux et al., 2009). V rombomeře r4 ryb a obojživelníků také vzniká v souvislosti s otickým pouzdem důležitý smyslový orgán larev těchto skupin tvořený Mauthnerovými neurony, které je možné použít jako marker identity r4 (van der Wees et al., 1998).

Při vývoji jako první vznikají centrální segmenty r3, r4 a r5, zatímco anteriornější a posteriornější segmenty se formují později (Graham et al., 2014). Zbylé dvě obratlovčí segmentární struktury, trup a farynx, narozdíl od rombencefala, nevznikají dělením celistvého primordia, ale postupným přirůstáním segmentů na posteriorním okraji dané struktury. Rombencefalon se tudíž liší od faryngu i trupového mesodermu nejen principem vznikání segmentů ale také pořadím, ve kterém segmenty vznikají. Zároveň je rombencefalon jakožto apomorfní znak obratlovců ze všech tří segmentárních systémů evolučně nejmladší, neboť je přítomný také u mihulí a sliznatek, ale nenachází se např. u kopinatce (Graham et al., 2014), který také v souladu s touto skutečností nemá neurální lištu.

Části centrální nervové soustavy, které se nacházejí anteriorně od rombencefala, nevykazují segmentární stavbu a je pro ně charakteristické to, že v nich nedochází k expresi genů *Hox*. Tyto anteriorní části embryonální nervové soustavy narozdíl od rombencefala charakterizuje aktivita transkripčních faktorů *Otx* (Krumlauf & Wilkinson, 2021), což je ostatně konzervovaný znak charakterizující nervovou soustavu a celkově tělní osu bilaterních živočichů obecně (Hannibal & Patel, 2013).



Obrázek 1: Tři systémy, které u obratlovců vykazují segmentární strukturu: A) - Somity trupového paraxiálního mesodermu; B) - Rombencefalon C) - Faryngové oblouky; (D-F) - Zobecněná schémata založená na datech získaných na vícero modelových organismech znázorňují faktory ovlivňující vznik segmentace u jednotlivých systémů. (E) - Ze segmentů rombencefala exprimujících gen *EphA4* nemigrují buňky neurální lišty. (F) - Vznik faryngových štěrbin a výchlipek vyžaduje signalizaci proteinů FGF a v případě posteriorních výchlipek také kyselinu retinovou (RA). Toto tvrzení o funkci kyseliny retinové je ovšem založeno pouze na jednom experimentu provedeném na embryu křepelky s deficiencí vitamínu A. Poznatky o nezbytnosti signalizace FGF pro vznik žaberních štěrbin pocházejí z experimentů na paprskoploutvé rybě *Danio rerio*. Existuje evidence, že ve všech těchto systémech se kyselina retinová (RA) podílí na určení anteroposteriorní polaritu struktury. Upraveno podle Graham et al. (2014).

Rombencefalon má důležitou funkci jako místo původu migrujících buněk hlavové neurální lišty do faryngových oblouků. Buňky neurální lišty migrují z rombencefala ve třech proudech. Nejvíce anteriorní, trigeminální (Graham, 2008), proud migruje do mandibulárního oblouku z preotických rombomer r1 a r2 a posteriorní části mezencefala, oddílu mozku, který se nachází anterioně od rombencefala. Hyoidní oblouk je kolonizován buňkami z rombomery r4 a do branchiálních oblouků migrují buňky neurální lišty z postotických rhombomer r6-r7(r8) (Minoux & Rijli, 2010). I když buňky neurální lišty vznikají také v rombomerách r3 a r5, tak do faryngových oblouků ve významnější míře nemigrují a namísto toho podstupují apoptózu řízenou signálním proteinem BMP4 a transkripčním faktorem MSX2 (Graham & Smith, 2001), (Graham et al., 1993).

Apoptóza je v těchto segmentech indukována signalizací ostatních rombomer, z nichž neurální lišta migruje. Přesná identita všech těchto signálů není jasná, ale je zřejmé, že segmenty r1 a r3 exprimují gen *EphA4* kódující efrinové receptory a zároveň všechny ostatní rombomery kromě r1 a r3 exprimují gen kódující jeho ligand, signální protein efrin. Rombomery r1 a r3 také exprimují gen transkripčního faktoru *Krox-20* (Graham et al., 2014), který lze použít jako marker anteriorní části rombencefala. Jak konkrétně tyto transkripční a signální faktory určují migraci buněk neurální lišty a charakter orgánů vznikajících z rombencefala, však není plně zmapováno.

1.1.2 Segmentace trupu

Nezávisle na tom, že mesoderm trupu vzniká při gastrulaci u různých skupin obratlovců odlišným způsobem, vykazuje paraxiální a intermediální mesoderm vždy aspoň přechodně segmentární stavbu. V tomto se trupový paraxiální mesoderm liší od paraxiálního mesodermu hlavy, který přinejmenším u tetrapodů segmentovaný není (Noden & Trainor, 2005), ačkoli se v minulosti mnoho autorů segmentární stavbu hlavového mesodermu pokoušelo prokázat (Hannibal & Patel, 2013). V hlavové části embrya sice vznikají u některých skupin obratlovců takzvané somitomery, které ale nelze považovat za plnohodnotné segmenty (Kardong, 2009). Somity se později dělí na sklerotomy, z nichž vzniká skelet a na dermatomyotomy, z nichž vzniká škára a svaly.

Somity vznikají postupnou diferenciací presomitického paraxiálního mesodermu, ke které dochází v anteroposteriorním směru. Zdá se, že hlavním mechanismem určujícím formování somitů je z jedné strany anteriorní gradient kyseliny retinové a z druhé strany posteriorní gradient faktoru FGF8 (Obrázek 1, D). Somity ale vznikají i za nepřítomnosti

signalizace kyseliny retinové, byť defektní a asymetrické Graham et al. (2014).

Mezi segmentovaným paraxiálním mesodermem a nesegmentovaným mesodermem laterální ploténky se tvoří intermediální mesoderm, které dává vznik rovněž segmentovaným přechodně existujícím pronefritickým orgánům. Pronefros přetrvává jako vylučovací orgán pouze v případě mihulí a sliznatek, kdežto u ostatních obratlovců přetrvává pouze pronefrický duktus, který se později mění na mesonefrický (Wolffův) duktus.

Míšní nervy rovněž vykazují segmentární uspořádání, avšak toto uspořádání není projevem segmentace míchy jako takové, ale je podmíněné segmentací somitů, přičemž anteriorní polovina každého sklerotomu atrahuje axony motorických a sensorických neuronů, zatímco posteriorní polovina sklerotomu rostoucí axony odpuzuje. Existence tohoto fenoménu byla poprvé demonstrována pomocí experimentu, při němž byly sklerotomy kuřat transplantovány v opačné orientaci, což vedlo k přesměrování růstu axonů (Keynes & Stern, 1984), (Kelly Kuan et al., 2004). Od té doby byla popsána řada faktorů ovlivňujících segmentaci míšních nervů, ale detaily celého procesu nebyly dosud dobře prostudovány a vliv kyseliny retinové nebyl rovněž prokázán.

Důležité je, že jediným endogenně segmentárním oddílem nervové soustavy je rombencefalon. Paraxiální mesoderm je tudíž segmentovaný podél celé délky těla kromě hlavy, zatímco neuroektoderm je intrinsicky segmentovaný pouze v hlavě, ale ne v trupu.

1.1.3 Farynx

Faryngové (faryngeální) oblouky jsou segmentární struktury obklopující přední část trávicí soustavy obratlovců. Přinejmenším během krátkého časového úseku ontogeneze jsou faryngové oblouky viditelné u všech obratlovců. Tato fáze, která se někdy označuje jako faryngula, je u obratlovců považována za takzvané fylogenetické stádium (Graham et al., 2014), (Duboule, 1994). Faryngové oblouky jsou komplexní struktury, na jejichž vzniku se podílejí buněčné populace pocházející ze všech tří zárodečných vrstev i neurální lišty. Často také obsahují repetitivní orgány náležící k vícero orgánovým soustavám, čímž splňují přísnější Batesonovu definici segmentace (Hannibal & Patel, 2013). Každý oblouk se skládá z mesodermálního jádra obklopeného buňkami neurální lišty a povrchových epitelů, které jsou zvnějšku ektodermální a zevnitř entodermální (Obrázek 2). Mezi oblouky vznikají faryngové štěrby, které se vytvářejí po kontaktu mezi vychlípeninami faryngového entodermu a povrchovým ektodermem. U mnoha, zejména pozemních,

obratlovců se štěrbinu neotevívají. V takových případech se mluví pouze o faryngových výchlipkách. Z mesodermu faryngových oblouků vznikají cévy oblouků aorty, které u obratlovců představují segmentárně uspořádanou část oběhové soustavy. Z buněk neurální lišty vznikají rovněž segmentované skeletální elementy hyobranchiálního skeletu tvořeného primárně chondroblasty (více v kapitole 1.1.3.1).

Přestože z buněk neurální lišty vzniká skelet a inervace faryngových oblouků, tak vznik oblouků samotných přítomnost neurální lišty nepotřebuje, jak ukazují experimenty, při nichž byla neurální lišta kuřete odstraněna a faryngové oblouky se přesto zformovaly (Veitch et al., 1999). Tyto experimenty si lze také vyložit jako důkaz toho, že faryngové oblouky nepotřebují buňky neurální lišty, protože jsou evolučně starší než neurální lišta, která je apomorfním znakem skupiny obratlovců, zatímco farynx vzniku obratlovců předchází (Graham, 2008).

Farynx je totiž evolučně vůbec nejstarší segmentární strukturou obratlovců a předchází vzniku obratlovců jako takových, neboť se segmentovaný farynx s žaberními štěrbinami (faryngotremie nebo branchiotremie) v nějaké podobě objevuje u všech druhoústých s výjimkou recentních ostnokožců, kteří ovšem farynx zřejmě ztratili druhotně (Graham & Richardson, 2012), (Graham, 2008), jak dokládají fosilie pravděpodobných prvohorních ostnokožců jako *Cothurnocystis* (Jefferies et al., 1996), (Smith, 2005), na nichž se dochovala zřetelná série žaberních štěrbin. Homologii žaberních výchlipků všech druhoústých dokládá koexprese genů transkripčních faktorů *Pax*, *Six* a *Eya* (*Eyeless*), která je charakteristická jak pro žaberní štěrbinu Hemichordata, tak pro faryngové výchlipky všech obratlovců (Gillis et al., 2011), (Simakov et al., 2015). Jako prekurzor faryngových štěrbin byly interpretovány dokonce póry na těle submikroskopické fosilie *Saccorhytus coronarius* z nejstarších vrstev kambria, která byla zprvu interpretována jako raný zástupce druhoústých (Han et al., 2017), což by znamenalo, že faryngové štěrbinu evolučně předcházejí i vzniku průchozí travicí soustavy. Pozdější analýzy však ukazují na to, že *Saccorhytus* patří pravděpodobněji mezi Ecdysozoa a domnělé žaberní štěrbinu nejsou anatomický znak, ale jsou výsledkem fosilizačních procesů (Liu et al., 2022). Některé více kontroverzní interpretace fylogeneze živočichů ale i tak pokládají přítomnost žaberních štěrbin za původní znak všech bilaterních živočichů, jejichž společného předka rekonstruují jako organismus se znaky druhoústých (Kapli et al., 2021).

Počet segmentů je napříč fylogenezí druhoústých značně variabilní. Zástupci skupin Hemichordata a Cephalochordata mají několik desítek víceméně morfologicky a funkčně nerozlišených žaberních štěrbin, které slouží primárně k získávání potravy filtrací. U

dospělých Cephalochordata se štěrbinu neotvírají přímo na povrch těla, ale ústí do peribranchiálního prostoru, během larválních stádií ale komunikují s vodním prostředím přímo. Ve skupině Urochordata se žaberní štěrbinu nacházejí pouze v larválních stádiích a po metamorfóze zanikají. Sliznatky mají 15 a mihule 9 faryngových oblouků, ale u fosilních bezčelistnatých obratlovců se vyskytuje i větší počet faryngových oblouků, který mohl podle některých rekonstrukcí zejména u anaspidů s redukovaným exoskeletem jako *Jamoytius* a *Euphanerops* dosahovat až třiceti (Janvier & Arsenault, 2007).

Plesiomorfním stavem čelistnatců (Gnathostomata) je pravděpodobně sedm faryngeálních segmentů (Kardong, 2009), (Witzmann, 2013). Pro čelistnatce je charakteristické to, že jednotlivé oblouky v evoluci získávaly odlišné morfologické a funkční charakteristiky. Základním znakem čelistnatců je transformace prvního faryngového oblouku na kostru čelistí. První faryngový oblouk čelistnatců se proto zpravidla označuje jako mandibulární. Druhý oblouk je často označován jako hyoidní. Pro zbylé, posthyoidní nebo také postotické, oblouky, se u čelistnatců používá označení žaberní nebo branchiální (Graham et al., 2014), (Pourquié, 2022). Během další fylogeneze čelistnatých obratlovců docházelo k četným přestavbám faryngového aparátu, které měly charakter jak zmnožování, tak redukce počtu segmentů a především pokračující funkční a morfologické specializace jednotlivých segmentů a žaberních štěrbin, případně výchlipek. Jednotlivé oblouky tak mohou být na vnější i vnitřní straně opatřeny různými deriváty a přídatnými orgány, stavba skeletu jednotlivých oblouků se může lišit a nové orgány mohou vznikat uvnitř výchlipek samotných, čehož je příkladem evoluce středního ucha v první faryngeální výchlipce.

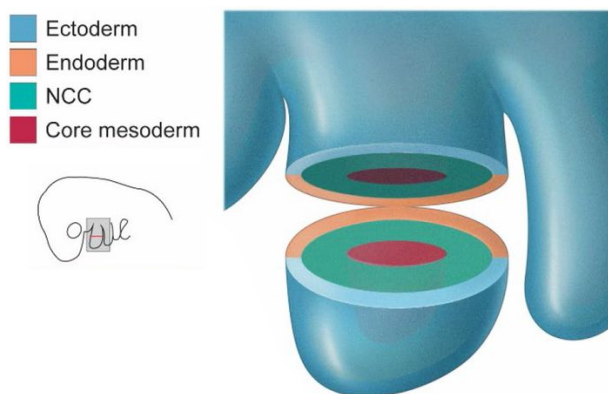
U současných čelistnatců s kostní tkání, tvoří hyoidní oblouk derivát zvaný operkulum, který během vývoje expanduje posteriorně a překrývá posthyoidní oblouky. U primárně vodních skupin obratlovců operkulum s trupem nesrůstá, zatímco u obojživelníků dochází při metamorfóze ke srůstání operkula s trupem a následné internalizaci branchiálních oblouků (Graham & Richardson, 2012). Během larválních stádií je ale operkulum volně pohyblivé a umožňuje komunikaci mezi vodním prostředím a faryngem skrze otevřené žaberní štěrbinu, které se rovněž uzavírají během metamorfózy.

Plesiomorfním stavem svaloploutvých (Sarcopterygii) je celkem sedm faryngových oblouků, jako je tomu v případě bahníků a latimerií. Ve skupině Tetrapoda se počet branchiálních oblouků redukoval maximálně na čtyři a tudíž mají Tetrapoda celkově šest faryngových oblouků. U současných obojživelníků se faryngeální segmentace plně rozvíjí pouze v larválních stádiích, kdy z buněk neurální lišty všech oblouků vznikají chrupavčité kosterní elementy hyobranchiálního skeletu, které se opět redukují při metamorfóze, pokud

daný druh metamorfózou prochází. Během evoluce amniotních obratlovců došlo k dalším přestavbám faryngového aparátu, které se projevují jednak redukcí čtvrtého a pátého segmentu a jednak tím, že se žaberní štěrby v průběhu ontogeneze nikdy úplně neotevírají a v případě nejvíce posteriorní výchlipky nemusí vždy docházet ani ke kontaktu mezi entodermem štěrby a povrchovým ektodermem. Posteriorní faryngové oblouky Amniota také tvoří jasně patrné segmenty jenom po velmi omezenou dobu, a to během embryogeneze v době okolo stádia takzvané farynguly. V pozdějších fázích ontogeneze v těchto obloucích nedochází ke skeletogenezi a myogenezi, v důsledku čehož přispívají ke vzniku anatomických struktur dospělého organismu jen minimálně a rovněž přerůstají posteriorně expandujícím operkulem. Na rozdíl od obojživelníků navíc u Amniota dochází ke srůstání operkula s trupem již během embryogeneze (Poopalasundaram et al., 2019), (Richardson et al., 2012).

Operkulum některých amniotních obratlovců, zejména šupinatých plazů, s trupem ani v dospělosti plně nesrůstá a může druhotně plnit funkce, které pochopitelně nesouvisejí s cirkulací vody skrz žaberní štěrby. Extrémním příkladem takového vývoje je agama límcová (*Chlamydosaurus kingii*), jejíž límec je vystužený také kosterními elementy prvních dvou postohyoidních oblouků (Montandon et al., 2019). Co se týče molekulární regulace těchto procesů, je známo, že posteriorní expanze operkula je poháněna především aktivitou signálního faktoru SHH (Richardson et al., 2012), který je u paryb exprimován v chlopních všech žaberních obloucích a tudíž jsou v tomto smyslu jednotlivé oblouky paryb uniformní (Gillis et al., 2011).

Redukce segmentů faryngu je v evoluci obratlovců častý jev, ale navýšení počtu oblouků je vzácné. Jedinou skupinou současných obratlovců, v níž došlo ke zmnožení segmentů je skupina paryb Hexanchiformes, jejíž zástupci mohou mít celkově osm nebo devět faryngových oblouků oproti původním sedmi (Tanaka et al., 2013). Zmnožení oblouků bylo v jednom případě dosaženo také experimentálně manipulací s geny Hox (oddíl 1.2.3).



Obrázek 2: Ilustrace savčích faryngových oblouků přibližně ve fylogenetickém stádiu. Zevnitř oblouky pokrývá entoderm a zvnějšku ektoderm. Uvnitř oblouků se nachází mesodermální jádro obklopené buňkami neurální lišty (NCC). Upraveno podle (Pushel et al., 2021).

1.1.3.1 Hyobranchiální skelet

U všech skupin obratlovců vzniká ve faryngových obloucích alespoň rudimentálně kostra hyobranchiálního aparátu, který je definován jako postmandibulární skelet (Roček, 2003), tj. kostra všech oblouků kromě mandibulárního, z něhož u Gnathostomata vznikají čelisti a spolu s hyobranchiálním skeletem tvoří viscerokranium, které dohromady s neurokraniem tvoří embryonální lebku. Hyalinní a často osifikující hyobranchiální skelet je plně vyvinutý především u primárně vodních skupin a larev obojživelníků, neboť během procesu terestrializace obratlovců postupně ztrácel na významu a prošel značnou redukcí.

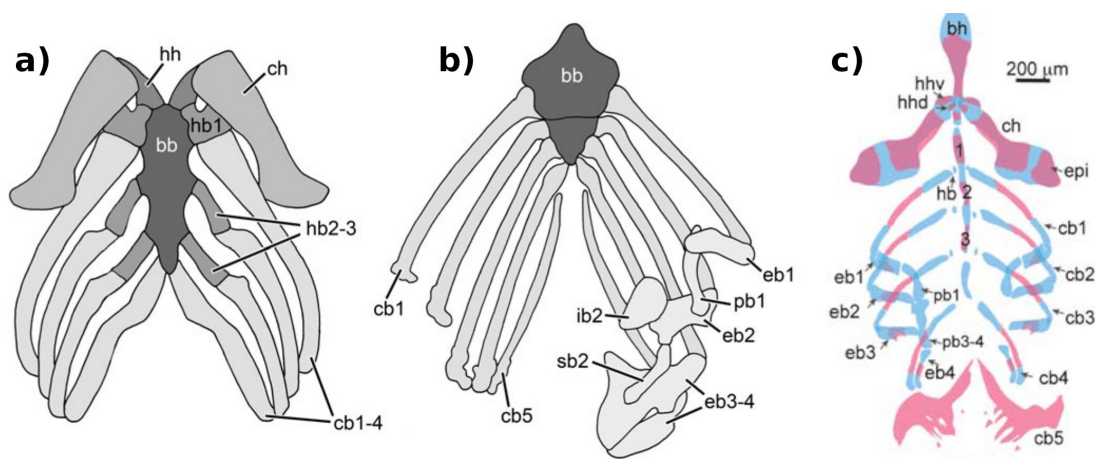
Přítomnost podpurných tkání ve faryngových obloucích je velmi starým znakem, protože Hemichordata a Cephalochordata mají v jednotlivých segmentech chrupavčité tyčinky, které ale u těchto skupin nejsou tvořeny chondroblasty, ale acelulární chrupavčitou tkání¹

Chrupavky hyobranchiálního skeletu obratlovců jsou tvořeny primárně chondroblasty, buněčným typem sekretujícím extracelulární materiál obsahující kolageny. Chondroblasty obratlovců diferencují z progenitorových buněk následkem aktivace transkripčního faktoru SOX9, který se mimo jiné prokazatelně váže na regulační elementy genů kódujících kolagen (Akiyama et al., 2004). Progenitorové buňky chondrocytů předtím diferencují z mezenchymu původem z neurální lišty nebo mesodermu (Sleight & Gillis, 2020) v reakci na signalizační faktory aktivující dráhu hedgehog. Aktivita genu *Sox9* je naopak inhibována přítomností β -kateninu, který je efektozem signalizace Wnt. Tato genová regulační síť pravděpodobně funguje u všech bilaterních živočichů, nezávisle na tom, jestli mají acelulární nebo celulární chrupavčité tkáně. K evoluci celulární chrupavky ale došlo pravděpodobně vícekrát apomorfně u různých skupin (Tarazona et al., 2016).

Plesiomorfním stavem čelistnatců je přítomnost chrupavčitých kosterních elementů v každém ze sedmi oblouků. Segmenty hyomandibulárního skeletu prvních čelistnatců rekonstruují jako víceméně morfologicky nerozlišené struktury sestávající z pěti skeletálních jednotek. Pro elementy skeletu každého posthyoidního (branchiálního) oblouku se používají označení basibranchiale, hypobranchiale, ceratobranchiale, epibranchiale a faryngobranchiale, přičemž se nejvíce mediálně a ventrálně nachází nepárová basibranchialia a nejvíce dorzálně faryngobranchialia. Počet segmentů jednotlivých oblouků rovněž podléhal během evoluce redukcí a u mnoha skupin se skelet jednotlivých oblouků

¹U Cephalochordata se celulární chrupavka vyskytuje pouze v orálních cirrech. Je možné, že celulární chrupavka obratlovců vznikla koopcí genové regulační sítě obdobných struktur (Jandzik et al., 2015).

liší v počtu z kosterních elementů, který může být redukován. U paprskoploutvých ryb mohou být basibranchiální elementy oddělené, anebo mohou úplně nebo částečně srůstat v jediný mediálně se nacházející nepárový element basibranchiale (Witzmann, 2013), (Obrázek 3). U mnoha skupin z basibranchiale anteriorně vyrůstá často ozubené basihyale (Obrázek 3). Hyoidní oblouk paprskoploutvých ryb, mezi něž patří také *Danio rerio* typicky sestává ze tří elementů, zatímco branchiální oblouky jsou tvořeny čtyřmi. Paprskoploutvé ryby často mají hyobranchiální skelet modifikovaný do podoby faryngeálních zubů, které se vyvíjejí na ceratobranchiálních posledního, většinou pátého, žaberního oblouku (Obrázek 3). V hyobranchiálním skeletu bichirů se vyvinuly některé znaky společné s Tetrapoda. Počet branchiálních oblouků je redukován na čtyři, basibranchiale je srostlé, skelet hyoidního a tří anteriornějších branchiálních oblouků sestává pouze ze dvou elementů hypobranchiale a ceratobranchiale, zatímco čtvrtý branchiální oblouk je tvořený pouze jedním elementem ceratobranchiale. Podobnosti s Tetrapoda ale vznikly u bichirů zřejmě paralelně (Britz & Johnson, 2003), protože svaloploutvé ryby (Sarcopterygii) včetně jejich recentních zástupců bahníků a latimerií mají pět branchiálních oblouků (Obrázek 3) a ve všech jsou zachována ceratobranchialia a faryngobranchialia. U některých fosilních tetrapodomorfů jako je *Eusthenopteron* se vyvíjí rovněž basihyale. U svaloploutvých ryb včetně tetrapodomorfů je také basibranchiale vždy tvořené dvěma srostlými elementy basibranchiale 1 a basibranchiale 2.



Obrázek 3: Obrázek 6: Hyobranchiální skelet paprskoploutvých a svaloploutvých ryb. b) - hyobranchiální skelet bichira (*Polypterus sp.*). Počet faryngeálních segmentů je u této skupiny oproti plesiomorfnímu stavu redukován na šest. Poslední oblouk se přitom odlišuje od zbylých branchiálních oblouků. V tomto případě sestává hyobranchiální skelet z méně kosterních elementů, přičemž hyobranchiale 4 (hb4) chybí. Navíc se na poslední oblouku vyvíjí faryngeální dentice. a) - schéma hyobranchiálního skeletu larvy kostnaté (teleostní) ryby *Danio rerio*. Obdobně jako je tomu v případě bichirů, je i poslední oblouk *Danio rerio* specializovaný v tom smyslu, že je opatřen faryngeálními zuby a chybí hypobranchiale. Teleostní ryby ovšem mají o jeden oblouk více než bichiri. c) - hyobranchiální skelet latimérie (*Latimeria chalumnae*). Upraveno podle (Witzmann, 2013) a (Delaurier, 2018).

Ze současných Tetrapoda je hyobranchiální skelet významněji zachovaný především v larválních stádiích ocasatých obojživelníků, zvláště u časněji se odvětvujících skupin (Schwarz et al., 2023), (Gao & Shubin, 2003). Pro obojživelníky (Lissamphibia) je charakteristický, a nejspíš plesiomorfní (Schoch & Witzmann, 2024), bifazický životní cyklus, sestávající z akvatického larválního stádia a terestrického reprodukčního stádia. Na pomezí obou fází dochází k více nebo méně radikálnímu procesu metamorfózy, při níž mnoho larválních struktur včetně některých skeletálních elementů zaniká. Larvy ocasatých obojživelníků mají maximálně šest faryngových oblouků, přičemž ze všech oblouků vznikají skeletální elementy čelistí a hyobranchiálního aparátu. Hyobranchiální skelet larev ocasatých obojživelníků je chrupavčitý a je stejně jako u tetrapodomorfů tvořen mediálním basibranchiálním elementem (bb), který se skládá ze dvou částí, anteriorního basibranchiale 1 (bb1) a posteriorního basibranchiale 2 (bb2). Na basibranchiale se napojuje skelet hyoidního oblouku tvořený elementy hypohyale (hh) a ceratohyale (ch).

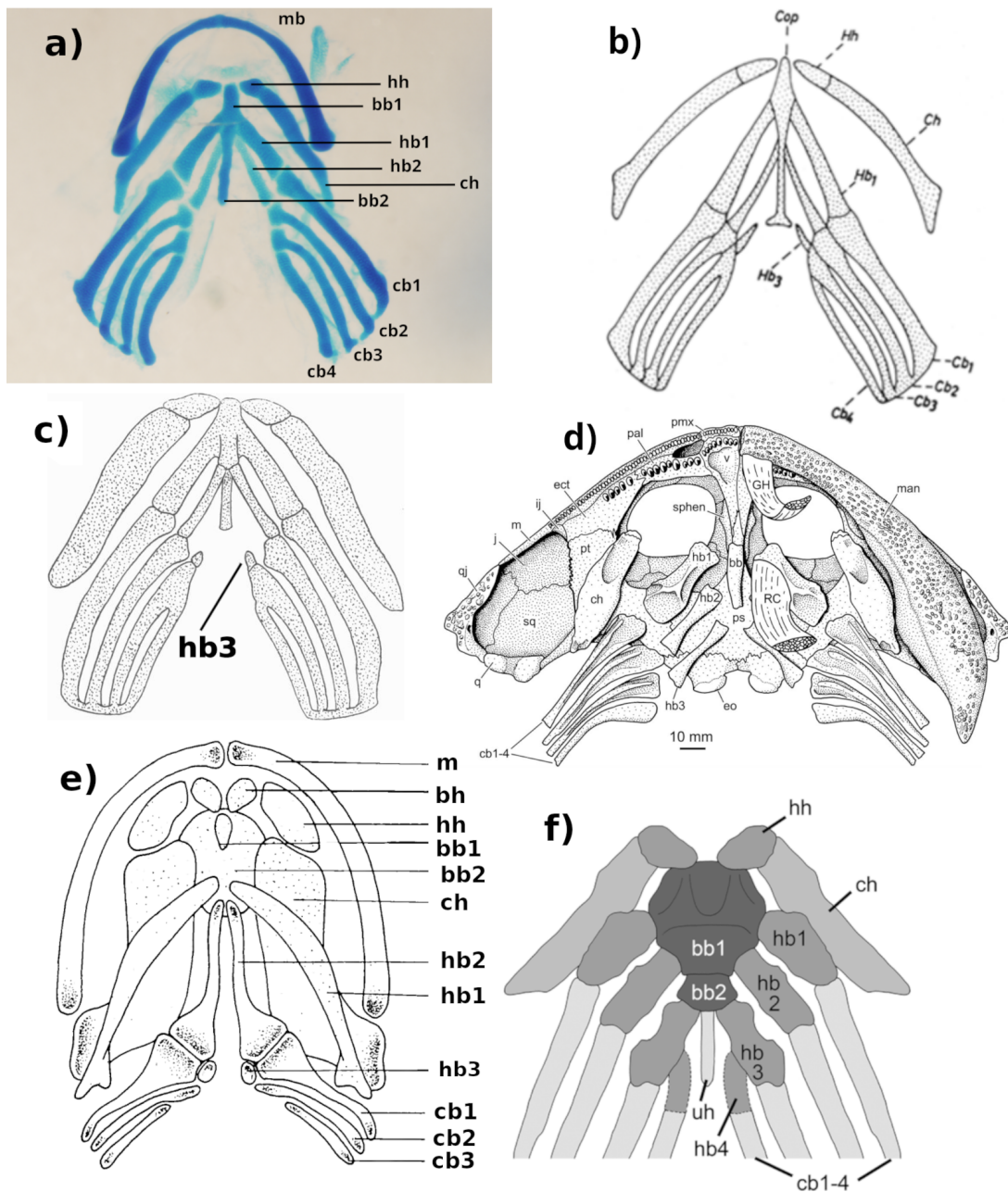
Posteriorněji se na basibranchiale napojují skeletální elementy branchiálních oblouků, jejichž stavba se u různých skupin ocasatých obojživelníků v některých důležitých detailech může lišit. U všech ocasatých sestává kostra prvních dvou branchiálních oblouků ze dvou tyčinkovitých elementů: hypobranchiale (hb) a ceratobranchiale (cb). Vzhledem ke struktuře kostry posteriorních žaberních oblouků ale existuje mezi různými skupinami ocasatých značná variabilita. Současné fylogenetické analýzy dělí ocasaté na dvě sesterské linie: Cryptobranchioidia a Salamandroidea (Schwarz et al., 2023), (Gao & Shubin, 2012), (Gao & Shubin, 2003). Kostra třetího branchiálního oblouku je pouze u dvou čeledí ocasatých, Cryptobranchidae a Hynobiidae, které se řadí to podřádu Cryptobranchioidea, tvořena dvěma elementy hypobranchiale 3 a ceratobranchiale 3, ale u příslušníků linie Salamandroidea včetně axolotla mexického je tvořena pouze jedním elementem, ceratobranchiale 3 (Schwarz et al., 2023), (Boy, 1974). Elementy ceratobranchiale 3 a ceratobranchiale 4 v případě axolotla nemají hypobranchiální segmenty a napojují se přímo na anteriornější ceratobranchiální segment (Obrázek 4, a). Je třeba podotknout, že u Cryptobranchioidea jsou elementy hypobranchiale 3 do značné míry rudimentární a nikdy se nenapojují na basibranchiale. Hyobranchiální skelet larev žab je stejně jako celé larvální stádium této skupiny značně apomorfní a je modifikovaný do podoby chrupavčitých desek a slouží především k filtraci spíše než k podpoře žaber (Roček, 2003).

Během metamorfózy ocasatých obojživelníků dochází v souvislosti s vývojem jazyka k redukcí hyobranchiálního skeletu, v rámci níž zanikají skeletální elementy všech branchiálních oblouků kromě prvního a části druhého, takže dospělý skelet branchiálních oblouků tvoří pouze hypobranchiale 1 a hypobranchiale 2 společně s ceratobranchiale 1. Od tohoto stavu se odlišují některé zřejmě apomorfní skupiny ocasatých, jako je tomu u čeledi Plethodontidae, kterým často chybí posteriorní ceratobranchiální segment ceratobranchiale 4 i v larválním stavu, anebo je ceratobranchiale 4 přinejmenším redukováno (Rose, 2003), (Rose, 1995), (Kerney et al., 2012). Celkově je v evoluci ocasatých obojživelníků patrný trend k redukcí hyobranchiálního skeletu. U některých fosilních zástupců ocasatých a kmenové skupiny Temnospondyli, uvnitř níž pravděpodobně obojživelníci (Lissamphibia) vznikli, se vyskytuje naopak větší počet elementů hyobranchiálního skeletu, než u dnešních ocasatých. Fosilní *Platycepsion wilkinsoni* měl pět párů ceratobranchiálí (Witzmann & Schoch, 2022) a skelet třetího žaberního oblouku fosilie *Gerrothorax pulcherrimus* měl na rozdíl od larev současných ocasatých plně vyvinuté hypobranchiale 3 (Obrázek 4, d), (Schwarz et al., 2023). Pro linii Cryptobranchioidea tvořenou čeleděmi Cryptobranchiidae a Hynobiidae je typická větší míra zachování hyobranchiál-

ního skeletu, která se projevuje především přítomností částečně se vyvíjejících chrupavek hypobranchiale 3 (Schwarz et al., 2023), (Edgeworth, 1923), (Rose, 2003), (Obrázek 4, b, c, e). V jedné z odvozeních linií salamandroidů, v čeledi plethodontidae, byla pozorována redukce počtu ceratobranchiálií na 3, přičemž může být tato redukce vnitrodruhově variabilní (Rose, 1995) a během evoluce reversibilní (Kerney et al., 2012).

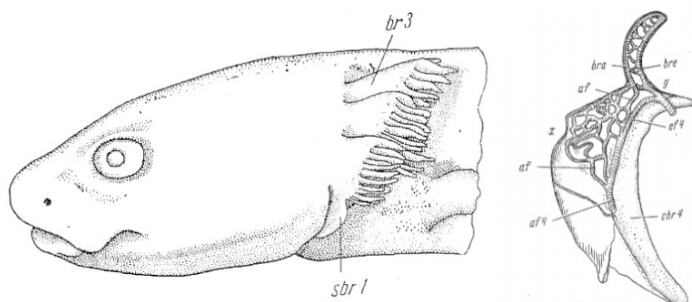
U lepidosaurií a archosaurií včetně ptáků jsou kosterní elementy ceratobranchiale 1 (cb1) a ceratobranchiale 2 (cb2) odvozené z prvního a druhého branchiálního oblouku stále poměrně značně zachované. U placentálních savců a zvláště primátů je celý hyobranchiální skelet silně redukovaný do té míry, že jedinými pozůstatky hyobranchiálního skeletu na lidské kostře je kostra jazyky tvořená kosterními elementy basihyale a rudimentárním ceratohyale, které jsou původem z hyoidního oblouku a kaudálnějším thyrohyale, které je pozůstatkem skeletu prvního branchiálního oblouku. Většina savců ale má přinejmenším skelet hyoidního oblouku vyvinutý do větší míry nežli primáti a typicky sestává z elementů ceratohyale, epihyale a stylohyale. Na kostře ptakopyska *Ornithorhynchus* a ježury *Tachyglossus* jsou dokonce posteriorně od thyrohyale viditelné další dva kosterní elementy označované jako thyrooidní oblouky 1 a 2, které by mohly být kostrou třetího a čtvrtého branchiálního oblouku (Zhou et al., 2019). Stylohyale je u člověka redukované na *processus styloideus* spánkové kosti (Li et al., 2022).

Z vývojového hlediska se příspěvek jednotlivých zárodečných vrstev k jednotlivým skeletálním elementům může lišit. V případě axolotla, který je předmětem této práce, vzniká celý hyobranchiální skelet z buněk neurální lišty s výjimkou basibranchiale 2, které vzniká z mesodermu (Sefton et al., 2015), (Davidian & Malashichev, 2013), (Sleight & Gillis, 2020). Meckelova chrupavka vzniká z buněk mandibulárního proudu neurální lišty, skelet hyoidního oblouku vzniká z hyoidního proudu a posthyoidní oblouky vznikají ze společného proudu buněk neurální lišty, který pochází z postotických rombomer. Navzdory společnému původu vykazují branchiální oblouky diferenciace, která se projevuje nejvýrazněji na morfologii hyobranchiálního skeletu a na přítomnosti vnějšího orgánu v podobě vnějších žaber. V souvislosti s hyobranchiálním skeletem obojživelníků je vhodné poukázat na nejednoznačnost názvosloví jednotlivých elementů. Mediálnějším elementem bývá některými, zejména staršími autory (Edgeworth, 1923), (Fox, 1959), (Kerney et al., 2012), označován jako ceratobranchiale, zatímco laterálnějším elementem bývá označován jako epibranchiale. Tato práce se řídí terminologií odpovídající popisu podle Rose (2003) a Rose (2014), podle níž se mediálnějším elementem označuje jako hypobranchiale a laterálnějším jako ceratobranchiale.

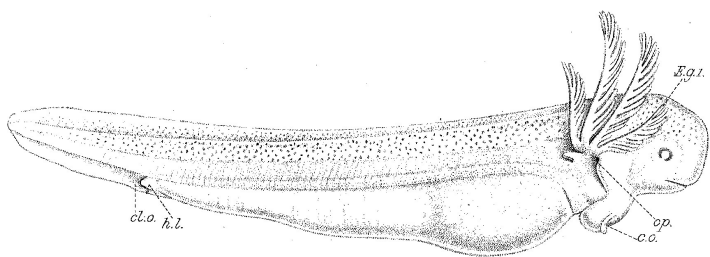


Obrázek 4: Hyobranchiální skelet ocasatých obojživelníků. a) - Hyobranchiální skelet larvy axolotla mexického o délce 15 mm. mb - mandibulare, hh - hypohyale, bb1 - basi-branchiale 1, hb1 - hypobranchiale 2, ch - ceratohyale, bb2 - basibranchiale 2, cb1 - ceratobranchiale 1, cb2 - ceratobranchiale 2, cb3 - ceratobranchiale 3, cb4 - ceratobranchiale 4. b) - Hyobranchiální skelet larvy pamloka džungarského *Ranodon sibiricus* (Hynobiidae). c) - Skelet *Hynobius neblus* (Hynobiidae) d) - Skelet triasového temnospondylního obojživelníka *Gerrothorax pulcherrimus*, u něhož je přítomen element hypobranchiale 3 (hb3), který je vyvinutý do stejné míry jako hypobranchiale 2. e) - skelet velemloka amerického (*Cryptobranchus alleganiensis*). f) - Hyobranchiální skelet tetrapodomorfního obratlovce *Tiktaalik rosae*. Upraveno podle Edgeworth (1923), Cox & Tanner (1989), Boy (1974), Witzmann & Schoch (2013), Downs et al. (2008). Popis obrázku e) byl změněn podle Elwood & Cundall (1994).

1.1.3.2 Vnější žábry



Obrázek 5: Vlevo: hlava juvenilního jedince druhu pamloka džungarského (*Ranodon sibiricus*). Vpravo: vypreparovaný čtvrtý žaberní oblouk s rudimentární vnější žábrou. cbr4 - ceratobranchiale 4. Upraveno podle (Shmalgauzen, 1968).



Obrázek 6: Larva bahníká amerického (*Lepidosiren paradoxa*) ve stádiu 32. Na hlavě jsou viditelné čtyři páry vnějších žaber. Upraveno podle (Kerr, 1900).

Vnější žábry jsou larvální respirační orgány, které vznikají jako specializovaný derivát faryngových oblouků některých skupin obratlovců. Ze současně žijících skupin se vyskytují u vodních larev obojživelníků, bahníků a také larev jedné skupiny paprskoploutvých ryb, bichirů. Tyto skupiny se ovšem liší v tom, na jakých faryngových obloucích jejich vnější žábry vznikají.

V larvální fázi životního cyklu většiny druhů obojživelníků se na branchiálních obloucích tvoří tři páry vnějších žaber. Larvy žab nejsou obecně vzato výjimkou, byť jsou u nich vnější žábry redukovány. V tomto ohledu jsou ovšem atypické larvy druhů *Xenopus laevis* a *Xenopus tropicalis* s internalizovanými žábry. Z tohoto důvodu se také vnějším žábřám nedostávalo mnoho pozornosti z hlediska vývojové biologie. Vnější žábry bichirů se odlišují od všech ostatních současných skupin obratlovců tím, že vznikají pouze jako jeden pár vyrůstající z hyoidního faryngového oblouku (Stundl et al., 2019).

Vnější žábry jsou ve fosilním záznamu doloženy u temnospondylních i lepospondylních tetrapodů (Witzmann, 2013), (Schoch & Witzmann, 2024) a jsou proto pravděpodobně plesiomorfii obojživelníků. V čeledi Cryptobranchidae jsou, jak poukazuje název,

druhodně redukovány. V evoluci ocasatých obojživelníků se mnohokrát nezávisle vyvinula neotenie a pedomorfóza spočívající v perzitenci larválních znaků i ve stavu pohlavní dospělosti. U neotenických nebo pedomorfických druhů obojživelníků, mezi něž patří také axolotl mexický, tudíž vnější žábry jakožto larvální znak přetrvávají po celý život jedince.

Na rozdíl od obojživelníků se situace u bahníků liší v tom, že se u bahníků ve větší míře zachovala plesiomorfni stavba faryngového aparátu, který v jejich případě sestává ze sedmi segmentů (více v části 1.1.3). Podobně jako larvy Tetrapoda mají i larvy bahníků, s výjimkou rodu *Neoceratodus*, vnější žábry. Narozdíl od Tetrapoda se však u larev bahníků vyvíjejí vnější žábry ve čtyřech párech, tj. opět na všech branchiálních obloucích s výjimkou posledního (Kerr, 1900), (Obrázek 6). Nejvíce posteriorní faryngový oblouk, v případě obojživelníků šestý, v případě bahníků sedmý, tak nenesé ani u jedné z těchto skupin vnější žábry. Přesto byl u juvenilních jedinců ocasatého obojživelníka pamloka džungarského (*Ranodon sibiricus*, Obrázek 5), zaznamenán ojedinělý výskyt rudimentární vnější žábry i na posledním, čtvrtém postthyoidním, oblouku (Shmalgauzen, 1968). Přítomnost rudimentárního čtvrtého páru vnějších žaber byla použita jako argument ve prospěch teorie, podle níž byly čtyři páry vnějších žaber u obojživelníků původním stavem. Interpretace fosilií, na níž se tato teorie zakládala však byla později zpochybněna (Schoch & Witzmann, 2011). Výskyt čtvrtého páru vnějších žaber může nicméně poukazovat na existenci latetního potenciálu pro aktivaci vyvojeého programu vnějších žaber také na šestém faryngovém oblouku.

Vnější žábry obojživelníků jsou tvořeny tyčinkami nazývanými *ramus*, na jejichž posteriorní straně se ve dvou řadách tvoří žaberní filamenty. Pod každou z obou řad filamentů se u obojživelníků nachází jeden ze dvou svalů označovaných jako *m. levatores et depressores branchiarium* umožňujících pohyb žaber (Ericsson & Olsson, 2004), (Ziermann & Diogo, 2013).

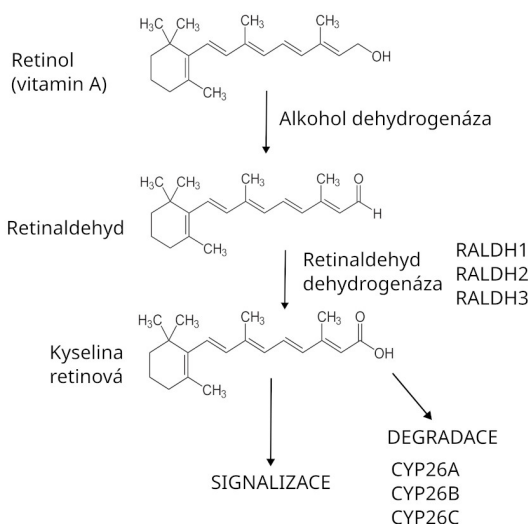
Na vnější žábry axolotla je možné pohlížet jako na dobře viditelné markery segmentární identity jednotlivých branchiálních oblouků. První branchiální oblouk nese vnější žábru a zároveň se v jeho skeletu nachází hypobranchiale. Druhý branchiální oblouk je morfologicky identický s prvním. Třetí branchiální oblouk nese vnější žábru, ale jeho skelet neobsahuje hypobranchiale. Čtvrtý branchiální oblouk nenesé vnější žábru a jeho skelet nemá hypobranchiale. Díky vnějším žábrám mají jednotlivé branchiální oblouky axolotla unikátní morfologickou identitu, která je navíc pozorovatelná zvnějšku.

1.2 Kyselina retinová v embryonálním vývoji obratlovců

Kyselina retinová (RA) je jednou ze základních signálních molekul v embryonálním vývoji obratlovců. Signalizace kyseliny retinové v embryonálním vývoji je pravděpodobně evoluční inovací druhoústých, jejichž společným znakem je zároveň přítomnost faryngových štěrbin a oblouků (Cañestro et al., 2006). Dlouhá historie experimentů s kyselinou retinovou jasně ukazuje, že kyselina retinová je mimo jiné jedním z hlavních faktorů určujících vývoj segmentárních struktur obratlovců.

1.2.1 Metabolismus a signalizace kyseliny retinové

Kyselina retinová vzniká v organismu obratlovců oxidací retinaldehydu pomocí aktivity enzymů retinaldehyd dehydrogenáz. Retinaldehyd je buď produkován enzymem retinol dehydrogenázou (a jinými alkohol dehydrogenázami) z retinolu (vitaminu A) nebo jej embryo získává ze žloutku (Niederreither & Dollé, 2008). Retinaldehyd dehydrogenázy jsou u obratlovců kódovány třemi geny označovanými jako *Raldh1*, *Raldh2* a *Raldh3*. Kyselina retinová difunduje z místa syntézy, přičemž jakožto malá molekula prochází jak cytoplasmatickými, tak jadernými membránami buněk. V jádře buněk se kyselina retinová váže na receptory kyseliny retinové (RAR a RXR), které působí přímo jako transkripční faktory určující aktivitu cílových genů. Geny, které reagují na kyselinou retinovou, jsou řízeny regulačními sekvencemi označovanými jako RARE (*retinoic-acid-response element*) (Cunningham & Duester, 2015). Obratlovci mají zpravidla tři různé receptory kyseliny retinové: RAR α , RAR β a RAR γ . Receptory RAR jsou také navzájem aspoň částečně redundantní, tj. funkce jednoho receptoru může být aspoň částečně nahrazena aktivitou jiného (Taneja et al., 1995).



Obrázek 7: Schéma signalizace kyseliny retinové. Produkce kyseliny retinové probíhá ve dvou hlavních krocích. V prvním kroku je retinol (vitamin A) oxidován na retinaldehyd enzymem retinal dehydrogenázou. Ve druhém kroku je retinaldehyd oxidován na kyselinu retinovou aktivitou retinaldehyd dehydrogenázy.

Signální dráha kyseliny retinové je rovněž unikátní v tom, že k její endogenní inhibici nedochází působením jiného protichůdného signálu, ale aktivní degradací signalizující molekuly. Degradaci kyseliny retinové zajišťují membránové enzymy cytochromy P450 kódované geny *Cyp26*, které oxidují kyselinu retinovou na kyselinu 4-oxo-retinovou. Kyselina 4-oxo-retinová nevykazuje žádnou signalizační aktivitu. Geny *Cyp26* se u obratlovců rovněž typicky vyskytují ve třech paralogních kopiích: *Cyp26a*, *Cyp26b* a *Cyp26c* (Cunningham & Duester, 2015). Normální embryonální vývoj obratlovců vyžaduje přesné načasování produkce a degradace kyseliny retinové zajišťované přesně regulovanou aktivitou genů *Raldh*, nebo naopak *Cyp26*. Zároveň musí v buňkách, v nichž má fungovat signaliace kyseliny retinové, být aktivní přinejmenším jeden z genů kódujících receptor kyseliny retinové.

Z důvodu chemického složení kyseliny retinové není prakticky možné studovat její aktivitu s použitím metod, které se běžně používají pro studium signálních proteinů. Výzkum aktivity kyseliny retinové se proto provádí nepřímou, a to buď pomocí analýzy exprese genů *Cyp26*, *Raldh* a *Rar*, anebo experimentální aktivací případně inhibicí signální dráhy kyseliny retinové. Méně často se používají také reportérové konstrukty obsahující sekvenci regulačního elementu RARE (Monaghan & Maden, 2012). Pro studium vlivu deficitu kyseliny retinové na vývoj embrya se, zejména u ptáků a savců, využívá také metoda založená na principu toho, že samice studovaného organismu, v níž se vyvíjí embryo, dostává potravu s nedostatkem vitamínu A (vitamin A deficiency, VAD), čímž je navozena nízká hladina kyseliny retinové uvnitř embrya uvnitř vejce nebo v těle samice (Reijntjes et al., 2005).

Kromě samotné kyseliny retinové je pro účely výzkumu k dispozici řada syntetických

aktivátorů a inhibitorů receptorů kyseliny retinové. Některé z těchto chemikálií působí specificky na určitý receptor a jiné inhibují, anebo naopak aktivují všechny receptory RAR zároveň. Často používaným nespecifickým aktivátorem RAR je látka v praxi označovaná jako TTNPB (Newcomer et al., 1993). Mezi nespecifické inhibitory všech RAR patří látky AGN193109 (Hauswirth et al., 2022), AGN194310 (Hammond et al., 2001) a BMS493 (Chazaud et al., 1999). Syntézu kyseliny retinové je také možné inhibovat pomocí 4-(diethylamino)benzaldehydu (DEAB) (Russo et al., 1988).

Vliv kyseliny retinové na vývoj organismu obratlovců je také možné pozorovat na přírodních i umělých mutacích v genech pro metabolismus kyseliny retinové, které byly popsány zvláště na modelu *Danio rerio*. Příkladem takových mutací jsou linie *neckless* (Begemann et al., 2001) a *no-fin* (Grandel et al., 2002). Obě tyto mutace byly lokalizovány v genu *Raldh2*.

1.2.2 Funkce kyseliny retinové v segmentaci rombencefala

Vliv kyseliny retinové byl prokázán také v případě segmentace rombencefala a migrace neurální lišty z rombomer. Buňky neurální lišty migrují ze segmentů rombencefala, rombomer, do faryngových oblouků, kde z nich vzniká jednak inervace oblouků a jednak hyobranchiální skelet. Buňky neurální lišty opouštějí rombomery ve třech proudech: mandibulární proud pochází z posteriorního mezencefala a rombomer r1 a r2, hyoidní proud neurální lišty pochází z r4 a branchiální proud pochází z rombomer r6 a r7. Mezi rombomerami produkujícími neurální lištu se jako mezery nacházejí rombomery r3 a r5, v nichž naopak buňky neurální lišty procházejí apoptózou.

U embryí *Danio rerio* s mutací *neckless* chybí skelet branchiálních oblouků a zároveň dochází k apoptóze i v segmentech r6 a r7 (Begemann et al., 2001). Je proto možné, že kyselina retinová je faktorem, který v kontextu posteriorního rombencefala umožňuje přežívání buněk neurální lišty tím způsobem, že zabraňuje aktivaci apoptózy.

Mutace v genu *RAR β* u embrya drápatky vyvolává expresi genu *Krox-20* ve všech rombomerách a zároveň se v postotických rombomerách tvoří Mauthnerovy neurony (kapitola 1.1.1), což znamená, že postotický rombencefalon získává anteriorní charakteristiky a celý rombencefalon získává identitu rombomer z nichž neurální lišta nemigruje (van der Wees et al., 1998), pokud nedochází k signalizaci kyseliny retinové.

Na základě těchto výsledků je možné tvrdit, že migrace buněk neurální lišty a tudíž vývoj faryngového aparátu, přinejmenším během zakládání faryngeálních segmentů,

vyžaduje signalizaci kyseliny retinové.

1.2.3 Homeotické transformace faryngového aparátu

1.2.3.1 Geny *Hox*

Homeotickou transformaci lze velmi obecně definovat jako změnu během vývoje organismu, která má za následek to, že daná struktura úplně nebo částečně získá podobu jiné struktury, která se už nachází na těle téhož organismu. Autor tohoto výrazu W. Bateson, od něhož zároveň pochází výraz metamerismus (Graham, 2008), píše doslovně: *...the essential phenomenon is not that there has merely been a change, but, that something has been changed into the likeness of something else* (Bateson et al., 1894). Jako homeotické transformace se typicky označují změny při nichž získávají segmenty metamericky organizovaných živočichů, nejčastěji členovců a obratlovců, charakteristiky jiného segmentu². Homeotické transformace je možné blíže charakterizovat jako anteriorní nebo posteriorní. Posteriorní homeotická transformace znamená přeměnu daného segmentu na segment, který se od tohoto segmentu nachází posteriorně. Anteriorní homeotická transformace znamená naopak přeměnu na více anteriorní segment.

Název genů *Hox* je zkratkou slova homeobox, které označuje sekvenci nukleotidů uvnitř těchto genů, která kóduje takzvanou homeodoménu, což je část proteinu se schopností vázat se na DNA. Název všech těchto molekulárně biologických objektů je odvozen z označení homeotický gen, které se pro tyto geny začalo používat na základě zjištění, že exprese jednotlivých genů, případně jejich kombinace, určuje identitu jednotlivých tělních segmentů octomilky a změna v jejich expresi vede ke změnám v identitě segmentů, o nichž je možné mluvit jako o homeotických transformacích (Lawrence & Morata, 1994). Geny *Hox* tedy byly prvním, ale jak se brzy ukázalo, nikoliv jediným faktorem, který má potenciál vyvolávat homeotické transformace.

Za vůbec první případ experimentálně vyvolané homeotické transformace v pravém slova smyslu (Maden, 1993) u obratlovců je považována abnormální regenerace ocasu žáby *Uperodon systoma*. Je-li pulcům tohoto druhu amputován ocas a regenerující blastém je vystaven zvýšené koncentraci retinylpalmitátu (prekurzoru kyseliny retinové), vyrůstá na ocase ektopický pár zadních končetin (Mohanty-Hejmadi et al., 1992). Později byly obdobné experimenty se stejným výsledkem provedeny na skokanovi hnědém (*Rana temporaria*) (Maden, 1993) a nejméně pěti dalších druzích žab (Morioka et al., 2018).

²Bateson také odlišuje homeotickou transformaci od meristické variability, která spočívá v pouhém zmnožení segmentů stejného typu

Pozoruhodné je to, že k těmto transformacím nedochází při zopakování stejného experimentu na embryích axolotla ani drápatky (Maden, 1993). Protože se v žádném z takových případů nejedná o modelové organismy, nebyla provedena dosud žádná analýza genové exprese v těchto ektopických končetinách a není jasné, zdali došlo ke změnám v expresi genů *Hox*. Zrovna tak není známo, jestli je v těchto končetinách exprimován gen *Tbx4* nebo *Tbx5* (dále v sekci 1.2.4) a není proto možné říci, zdali se jedná o duplikaci předního nebo zadního páru končetin. V takovém případě by se v ocase aktivovaly geny *Hox*, které jsou za normálního stavu aktivní v trupové části těla. Podle alternativní interpretace tyto výsledky demonstrují spíše než transformaci ocasu ve trup potenciál ocasní ploutve transformovat se v končetinu a jsou dávány do souvislosti s ocasními ploutvemi latimérie, které vykazují nápadnou podobnost s párovými ploutvemi a navíc jsou v případě svaloploutvých blízce spřízněné s končetinami Tetrapoda. Během těchto experimentů totiž nevznikají ektopické končetiny pouze laterálně, ale také na ventrální a dorzální straně regenerovaného ocasu spolu s ocasní poutví a zároveň se spolu s nimi nemusejí vždy tvořit kosterní elementy připomínající pletence končetin (Morioka et al., 2018).

Pozoruhodnou vlastností genů *Hox* je takzvaná prostorová a časová kolinearita, což znamená, že geny, které se nacházejí blíže k 3' konci chromozomu jsou exprimovány v segmentech, které se na těle octomilky nacházejí více anteriorně a formují se dříve než posteriornější segmenty. Na těle obratlovců je ovšem z mnoha důvodů těžší demonstrovat korespondenci mezi kolineární expresí genů *Hox* a jednotlivými segmenty na těle daného organismu. Zatímco celé tělo octomilky je jediným segmentárním systémem a jednotlivým segmentům víceméně přesně odpovídají geny *Hox* nacházející se ve stejném pořadí na chromozomech, obratlovci mají segmentární systémy nejméně tři, přičemž všechny nemusejí vznikat najednou. Zároveň se na rozdíl od octomilky nacházejí v genomu obratlovců geny *Hox* přinejménším ve čtyřech sadách (A,B,C,D), z nichž žádná není kompletní (Duboule, 2007). Experimenty na buněčných kulturách ukazují, že pro aktivaci genů *Hox*, které se nacházejí nejvíce v pozici 3' postačuje menší koncentrace kyseliny retinové než je tomu pro aktivaci více posteriorních genů (Langston & Gudas, 1994), zatímco použití signálních proteinů FGF vede k opačnému efektu (Nolte et al., 2019). Tato přímá závislost, kterou je možné demonstrovat na buněčných kulturách však nemusí vždy fungovat při vývoji organismu. V rámci experimentů provedených na myších bylo ukázáno, že pokud je kyselina retinová aplikována během gastrulace, tak skutečně dojde k anteriorní homeotické transformaci axiálního skeletu páteře a hrudního koše, která je zároveň doprovázena anteriorním posunem exprese genů *Hox*, zatímco aplikace kyseliny retinové během diferenciac

somitů, to znamená v pozdější fázi vývoje, nemá vliv na expresi genů *Hox*, ale přesto vede k anteriorní homeotické transformaci axiálního skeletu (Kessel, 1992), (Nolte et al., 2019).

Experimenty podobného typu byly později provedeny i s použitím inhibitoru AGN193109 (Hauswirth et al., 2022). Inhibice receptorů RAR v postgastrulačních stádiích vedla k posteriorní homeotické transformaci hrudních obratlů myši (na jednom páru sakrálních obratlů se vyvinula žebra). Efekt AGN193109 je v těchto případech amplifikován delecí genu *Gdf11*, který je zřejmě faktorem odpovědným za přechod mezi jednotlivými oddíly páteře.

Vedle trupu se geny *Hox* podílejí i na vyvoji hlavových segmentárních struktur, rombencefala a faryngu. Buňky neurální lišty exprimující určitou kombinaci genů *Hox* migrují do faryngových oblouků z rombomera a posteriorní části mesencefala. Buňky neurální lišty často, ale ne vždy, exprimují stejnou kombinaci genů *Hox* jako rombomera z níž pocházejí. Výjimkou jsou mezektodermální buňky migrující z rombomery r1 mandibulárního oblouku, které žádné geny *Hox* neexprimují. Nejvíce anteriorní segmenty rombencefala namísto toho exprimují geny *Otx* (Waskiewicz et al., 2002).

O tom, že exprese genů *Hox* v migrujících buňkách neurální lišty není pevně daná a může se měnit pod vlivem vnějších faktorů, svědčí také experimenty, při nichž byly rombomery transplantovány na více rostrální pozici, ale migrující buňky neurální lišty si zachovaly normální expresi genů *Hox* (Guthrie et al., 1992). Naopak transplantace rombomera na více kaudální pozici vede ke změně exprese genů *Hox* v buňkách, které z nich pocházejí, přičemž tyto buňky získají více posteriorní profil exprese genů *Hox* (Favier & Dollé, 1997), což by mohlo poukazovat na nezbytnost určitého posteriorního signálního faktoru nutného pro aktivaci posteriornějších genů *Hox*, které už zůstanou aktivní i tehdy, když se dostanou mimo zónu působení takového faktoru.

S konkrétními geny *Hox* byla relativně spolehlivě propojena identita dvou nejvíce anteriorních faryngových oblouků. Nejprve se ukázalo se, že delece genu *Hoxa2* u myši vede k homeotické transformaci hyoidního oblouku na mandibulární (Gendron-Maguire et al., 1993), (Rijli et al., 1993). Stejného výsledku jako u myši bylo dosaženo i po utlumení exprese (knockdownu) genu *Hoxa2* u drápatky (*Xenopus laevis*) (Baltzinger et al., 2005) a *Danio rerio* (Hunter & Prince, 2002). *Hoxa2* je rovněž exprimován v posteriorně expandujícím operkulu ptáků (Richardson et al., 2012) a přinejmenším u paprskoploutvých ryb a paryb se váže na regulační elementy genu *Shh*, který je nezbytný pro růst operkula (Barske et al., 2020).

Pozdější genetické experimenty demonstrovaly, že pokud je u embrya myši v buňkách

neurální lišty provedena delece všech genů sady *Hoxa*³, dochází ke vzniku chrupavčitého kosterního elementu ve všech čtyřech posteriornějších faryngových obloucích, což je možné interpretovat jako homeotickou transformaci všech posteriornějších oblouků na mandibulární oblouk (Minoux et al., 2009).

Faryngové oblouky se proto chovají podobným způsobem jako rombomery v tom smyslu, že v případě ztráty exprese genů *Hox* získávají identitu nejvíce anteriorního segmentu (Waskiewicz et al., 2002).

Jediným experimentem, při němž došlo ke zvýšení počtu faryngových oblouků, je duplikace branchiálního oblouku paprskoploutvé teleostní ryby (*Oreochromis niloticus*), jíž bylo docíleno pomocí knockdownu genů *Hoxa2a*, *Hoxa2b* a *Hoxb2a* (Le Pabic et al., 2010). Mechanismus, který je za tento fenotyp zodpovědný není jasný a interpretace těchto výsledků je ztížena tím, že teleostní ryby mají následkem celogenomových duplikací geny *Hox* ve více kopiích (Glasauer & Neuhauss, 2014).

Faryngeální region kopinatců je charakterizován koexpresí genů *Pax1/9*, *Pitx* a *Otx*. Posteriorní hranici těchto markerů je možné pokládat za posteriorní hranici faryngu. Inhibice receptorů RAR může hranici mezi faryngem a trupem posunout posteriorním směrem. Jinými slovy se farynx prodlužuje a trup se zkracuje, což by naznačovalo, že aktivace signalizace kyseliny retinové, případně překročení určité prahové hodnoty koncentrace kyseliny retinové, může rozhodovat o umístění přechodu mezi faryngem a trupem (Schubert et al., 2005) (Escriva et al., 2002). Zároveň se ukázalo, že faktorem zprostředkujícím přechod mezi dvěma sadami transkripčních faktorů kopinatce je gen *Hoxb1* (Schubert et al., 2005). Podobných výsledků je možné dosáhnout, je-li embryo kuřete vystaveno inhibitoru receptorů RAR (BMS453), následkem čehož se anteroposteriorní markery rovněž posouvají posteriorně (Bayha et al., 2009). Na srovnání exprese genů *Hox* ve faryngovém aparátu žraloka a kuřete je patrné, že gen *Hoxb1* značí nejvíce posteriorní segment bez ohledu na celkový počet faryngeálních segmentů (Shone et al., 2016). U kopinatce je právě *Hoxb1* genem, který aktivuje sadu transkripčních faktorů určujících přechod mezi faryngem a trupem. V těchto studiích byl posteriorizující efekt inhibice receptorů kyseliny retinové demonstrován na doménách exprese genů značících přechod mezi trupem a žaberní oblastí, ale nebyla zdokumentována žádná morfologická transformace faryngových segmentů. Příklady homeotických transformací způsobené změnami v signalizaci kyseliny retinové však existují.

³Toho je možné docílit kondicionální rekombinací, při níž je aktivace rekombinázy podmíněna expresí genu *Wnt1*, markeru hlavové neurální lišty

1.2.3.2 Homotoické transformace spojené s kyselinou retinovou

U mutantů *Danio rerio neckless* (*nls*) chybí všechny elementy hyobranchiálního skeletu kromě hyoidního oblouku. Analýza tohoto fenotypu ukázala, že mutace *nls* se nachází v genu *Raldh2* a aplikace kyseliny retinové může částečně zmírnit defekt skeletu faryngových oblouků (Begemann et al., 2001). Mutant *nls* zároveň nemá prsní ploutve, což je ale rovněž možné zvrátit aplikováním kyseliny retinové. Kyselina retinová je tudíž při postgastrulačním vývoji parpskoplovtvých ryb nezbytná pro vývoj prsních ploutví, hyobranchiálního skeletu a dokonce žaberních oblouků jako takových, protože mutant *neckless* nemá ani žaberní výchlipky, které by oddělovaly jednotlivé segmenty. Mutant *neckless* zároveň vykazuje defektní vývoj posteriorních ale nikoliv anteriorních rombomer. Tyto výsledky poukazují na to, že kyselina retinová syntetizovaná v somitech má zásadní vliv na vývoj struktur na přechodu mezi hlavou a trupem, na vývoj ploutví stejně jako na vývoj faryngu a rombencefala. Velmi podobný fenotyp má také mutace *no-fin* taktéž lokalizována v genu *Raldh2*. Ryby s mutací *no-fin* mají pouze jeden branchiální kosterní segment a chybí jim také prsní ploutve (Grandel et al., 2002). Po aplikaci kyseliny retinové dochází u jedinců s mutací *no-fin* k částečnému obnovení normálního vývoje, kdy je hyobranchiální skelet stále zkrácený, ale namísto jednoho branchiálního segmentu obsahuje čtyři.

Mutanti *neckless* a *no-fin* se také nápadně podobají fenotypu myši s mutací v genu *Raldh2* (Niederreither et al., 1999), jimž chybí třetí a čtvrtý branchiální oblouk. Stejněho výsledku je u myši možné dosáhnout pomocí inhibitorů receptorů kyseliny retinové (Wendling et al., 2000) a u potkana pomocí potravy deficientní na vitamin A (White et al., 2000). Inhibice syntézy kyseliny retinové na embryu *Danio rerio* má za následek podobný fenotyp, jaký je k vidění u jedinců s mutací *neckless*, a totiž redukcí branchiálních oblouků včetně žaberních štěrbin, která je tím výraznější, čím dříve je aplikován inhibitor syntézy kyseliny retinové (Kopinke et al., 2006). Podobně u embryí vyvíjejících se ve vejcích křepelky, která dostávala potravu s deficitem vitamínu A, nedochází ke vzniku posteriorních faryngových výchlipek. Analýza genové exprese provedená na embryích získaných z tohoto experimentu ukazuje, že posteriorní výchlipky exprimují gen *Raldh2*, ale anteriorní výchlipky, které se otevírají i v případě deficitu kyseliny retinové, *Raldh2* neexprimují. Tento experiment sice demonstruje, že anterioposteriorní gradient kyseliny retinové má klíčovou funkci při vzniku faryngového aparátu, ale týká se pouze výchlipek, zatímco na obloucích samotných nebyl v tomto případě pozorován žádný významnější efekt (Graham et al., 2014),(Poopalasundaram et al., 2019). Efekt zvýšené koncentrace kyseliny retinové na

morfologii hyobranchiálního aparátu obojživelníků byl demonstrován na larvách axolotla mexického, u nichž je patrná absence posteriornějšího kosterního elementu basibranchiale 2 jako následek aplikace kyseliny retinové, což si jednak lze vykládat jako evidenci toho, že skeletální elementy odvozené z mesodermu (basibranchiale 2) reagují na kyselinu retinovou jinak než elementy vznikající z neurální lišty a jednak jako anteriorní homeotickou transformaci hyobranchiálního skeletu (Sefton et al., 2015).

U cypriniformních ryb, mezi něž patří také *Danio rerio*, se vyskytují zuby pouze na posledním, sedmém, faryngovém oblouku (Obrázek 3), zatímco orální zuby v normálním stavu chybějí. Vývoj faryngeální dentice je možné zablokovat, pokud je embryo *Danio rerio* vystaveno inhibitoru syntézy kyseliny retinové v čase 36 hodin po oplození, kdy už jsou zformovány všechny faryngové oblouky (Gibert et al., 2010). Vložení implantátu sekretujícího kyselinu retinovou do embrya *Danio rerio* naopak vede k vývoji zubů na anteriornějších obloucích (Seritrakul et al., 2012), což si lze vykládat jako anteriorní homeotickou transformaci.

Obecně však lze říci, že existuje experimentální evidence poukazující na přítomnost anteroposteriorního gradientu kyseliny retinové ovlivňujícího vývoj faryngeálního aparátu na úrovni žaberních výchlipek a hyobranchiálního skeletu. Zvýšená koncentrace kyseliny retinové však může vyvolávat jak posteriorní, tak anteriorní homeotické transformace segmentů faryngu, rombencefala i trupu v závislosti na druhu daného organismu a stádiu vývoje. Co se týče genů *Hox*, je poměrně dobře prokázáno, že identita mandibulárního segmentu je specifikována absencí jakýchkoli genů *Hox* a identita hyoidního segmentu je specifikována expresí genu *Hoxa2*. Jakým způsobem určují geny *Hox* identitu branchiálních oblouků, která ale zjevně existuje, není jasné, snad s výjimkou toho, že *Hoxb1* může být evolučně konzervovaným faktorem určujícím přechod mezi faryngem a trupem.

1.2.4 Funkce kyseliny retinové při vývoji párových končetin a ploutví

Kromě vlivu na vývoj segmentárních struktur existuje řada důkazů pro zásadní funkci kyseliny retinové při vývoji obratlovčích končetin a párových ploutví. Vystavení embryí zvýšené koncentraci kyseliny retinové vede k zablokování iniciace předního páru končetin, ale nikoliv zadního páru končetin. Myším s mutací v genu *Raldh2* (u myši ALDH2), chybí přední pár končetin, ale zadní je ovlivněn minimálně (Niederreither et al., 2002). Zároveň existují důkazy, že zakládání končetin a s ním spojená aktivace genu *Tbx5* vyžaduje přítomnost kyseliny retinové exprimované somity (Gibert et al., 2006).

Funkce kyseliny retinové při iniciaci vývoje předního páru končetin je vysvětlována tak, že kyselina retinová za normálních okolností reprimuje expresi genu *Fgf8*, jehož produkt v částech trupu s nízkou koncentrací kyseliny retinové inhibuje produkci transkripčního faktoru TBX5. Gen kódující transkripční faktor TBX5 je totiž exprimován pouze v základech předního páru končetin, kdežto zadní pár končetin je zřejmě regulován transkripčním faktorem TBX4 (Cunningham & Duester, 2015), který kyselinu retinovou pro svou aktivaci zřejmě nepotřebuje. Přirozený mutant *Danio rerio* s mutací v genu *Tbx4* proto také nemá břišní ploutve (Don et al., 2016). Prsní ploutve chybí také u mutantu *neckless* (oddíl 1.2.3), u něhož se později ukázalo, že absenci předního páru ploutví způsobuje opět inaktivace *Tbx5*, k níž dochází v nepřítomnosti kyseliny retinové. U linie *no-fjn* rovněž chybí vinou mutace v *Raldh2* prsní ploutve, což je sice možné zvrátit aplikováním kyseliny retinové, ale pouze v určitém časovém úseku, a totiž po započetí somitogenenze, přesněji ve stádiu s 10 somity (Grandel & Brand, 2011), (Grandel et al., 2002).

Kyselina retinová je tudíž u modelových obratlovců zásadním faktorem pro iniciaci přinejmenším předního páru končetin, ale v pozdějších fázích vývoje končetiny je její přítomnost naopak teratogenní. Zdá se, že kyselina retinová musí být v pozdějších fázích vývoje končetiny aktivně degradována aktivitou genu *Cyp26b*, jehož knockout vede ke vzniku rudimentárních končetin (Yashiro et al., 2004). Kyselina retinová proto má při vývoji končetiny dvojí roli: její aktivita je nezbytná pro založení končetiny, ale pro pokračující vyrůstání struktury musí být aktivně odstraňována.

1.3 Shrnutí úvodu a cíle práce

Faryngové oblouky jsou jednou ze základních stavebních jednotek tělního plánu obratlovců a zároveň jsou evolučně nejstarší obratlovčí segmentální strukturou.

Existuje relativně rozsáhlá experimentální evidence pro tvrzení, že identita mandibulárního oblouku je určena absencí genů *Hox* a identita hyoidního oblouku je daná expresí genu *Hoxa2*. Vznik těchto dvou nejvíce anteriorních segmentů zároveň není významně ovlivněn absencí kyseliny retinové. O faktorech určujících počet a morfologickou variabilitu branchiálních segmentů se ale mnoho neví a dosavadní výsledky ukazují na zřejmou byť rozporuplnou funkci kyseliny retinové. Morfologická variabilita faryngových oblouků evidentně existuje, ale dosud nebyly jednoznačně identifikovány faktory, které ji určují.

Kyselina retinová je prokazatelně faktorem, který může měnit segmentární identitu obratlovců, ale dosud nebyl demonstrován její vliv na segmentaci faryngu tak, jak byl

demonstrován v případě trupu a rombencefala.

Axolotl mexický je vhodným modelovým organismem pro studium této variability, protože se u něho variabilita branchiálních oblouků projevuje jednak v přítomnosti nebo nepřítomnosti vnějších žaber na jednotlivých obloucích a jednak ve stavbě hyobranchiálního skeletu. Vnější žábry kromě toho, že samy o sobě nejsou dobře prostudovaným orgánem, proto představují potenciální indikátor identity konkrétních segmentů.

Hlavním cílem práce je zjistit, zdali je kyselina retinová faktorem, který významněji ovlivňuje vývoj vnějších žaber axolotla a identitu segmentů faryngového aparátu obecně.

ílí cíle:

- a) Připravit próby pro in situ hybridizaci genů regulujících metabolismus kyseliny retinové (*Raldh*, *Cyp26*, *Rarβ*) a zdokumentovat jejich časovou a prostorovou lokalizaci ve stádiích, během nichž vznikají vnější žábry.
- a) Provést experimenty s farmakologickými inhibitory receptorů kyseliny retinové a zdokumentovat následný fenotyp, bude-li pozorován.
- c) Provést barvení hyobranchiálního skeletu za účelem stanovení změny vnitřní struktury faryngeálních segmentů.

2 Materiály a metody

2.1 Embryonální materiál

Embrya axolotla pocházejí z chovů katedry zoologie PřFUK, Viničná 7, Praha 2. Z každého vejce byly ručně odstraněny vaječné obaly. Vývojová stadia byla určena podle vývojové tabulky (Bordzilovskaya et al., 1989).

2.2 Analýza genové exprese

2.2.1 Příprava prób na ISH

2.2.1.1 *Cyp26b*

Sekvence genu *Cyp26b1* byla získána ze serveru axolotl-omics.com (AMEX60DD301046276.2). S použitím algoritmu primer3plus.com byly nalezeny sekvence potenciálních primerů: 5'GGCAACGGTATCCTCCACAA-3' a 5'-TTTCATTCTCCCTGCCCC-3'. Pomocí těchto primerů byly amplifikovány fragmenty z cDNA získané z RNA izolované z homogenizovaných embryí axolotla ve stádiích 24, 28 a 30 s použitím přípravku TRIzol™

(Invitrogen). Pomocí sady SuperScript™ VILO™ (ThermoFisher) byla z takto izolované RNA připravena cDNA. Výše uvedené primery byly použity pro PCR, při níž do reakce vstupovala tato cDNA. Amplifikované fragmenty byly poté vloženy do plasmidů pGEM-T Easy Vector System I (Promega) obsahujících štěpící místa, počáteční místa transkripce, sekvence pro sekvenační primery, gen pro ampicilinovou rezistenci a *Lac* operon umožňující modro-bílou selekci transformovaných buněk. Plasmidy byly poté transformovány do kompetentních buněk linie DH5 α , které byly vysety na agarové plotny o průměru 15 cm s LB médiem, X-gal (70 μ l), IPTG (70 μ l) a ampicilinem 100 μ g/ml. Buňky byly kultivovány přes noc ve 37° C, načež byly pozitivní bílé kolonie otestovány pomocí PCR s použitím sekvenačních primerů M13R a M13F. Z jedné z pozitivně testovaných kolonií byl odebrán vzorek použitý na inokulaci kapalného LB média, v němž byly buňky přes noc kultivovány. Bakteriální suspenze byla nejprve zcentrifugována a následně z ní byla izolována plasmidová DNA pomocí metody alkalické lýze. Získaná DNA byla poté purifikována pomocí fenolu a chloroformu a vzorek z této DNA byl odeslán na sekvenaci metodou Sangerova sekvenování. Plasmid byl naštěpen endonukleázou SacI a byl použit na in vitro transkripci pomocí polymerázy T7.

2.2.1.2 *Rar* β

S použitím algoritmu primer3plus.com byly v sekvence AMEX60DD301029578.5 nalezeny potenciální primery genu *RAR* β : 5' -GGAACCTGGTTTGACCAAGA-3' a 5' -AATCACCTCCTCAA-AGCCG-3'. Proces výroby próby dále proběhl stejně jako v případě genu *Cyp26b* (oddíl 2.2.1.1).

2.2.1.3 *Raldh2*

Plasmid obsahující templát na přípravu próby genu *Raldh2* byl poskytnut Tanaka Group, IMP, Vídeň.

2.2.2 In situ hybridizace

In situ hybridizace byla provedena podle podobného protokolu, jaký byl popsán v publikaci Šimková et al. (2023). Embrya skladovaná v metanolu při teplotě -21°C byla ve 2 ml plastových mikrozkušavkách rehydrována do roztoku Ptw. Ptw: PBS + DEPC (100 μ l/100ml) + 0,1% Tween-20 (100 μ l/100ml). Embrya poté byla inkubována v roztoku proteinázy K v PBS (60 g/ml) na 5 ml Petriho miskách po dobu 15 min a pak byla fixována v roztoku 4% formaldehydu a 0,2% glutaraldehydu po dobu 30–120 min. Po fixaci byla

embrya převedena do promývacího roztoku (na 50 ml roztoku: 25 ml formamidu, 2,5 ml 20×SSC, 250 μ l, 20% Tween-20, dH₂O doplněna do 50 ml), ve kterém byla ponechána minimálně 3h. Po minimálně 3h byl promývací roztok vyměněn za hybridizační roztok: 25 ml formamidu, 1×hybridizační pufr podle Denhardta, kvasinková tRNA (1 mg/ml), 0,1% Tween-20, 5-10% dextran sulfát, 1x roztok solí (0,2 M NaCl; 8,9 mM Tris-HCl; 1,1 mM Tris; 5 mM NaH₂PO₄·H₂O; 5 mM Na₂HPO₄; 5 mM EDTA), ve kterém byla rozpuštěna RNA próba (oddíl 2.2.1) v koncentraci 1-10 μ l/1 ml) a vzorky byly v hybridizačním roztoku inkubovány přes noc při teplotě 60°C. Další den byl hybridizační roztok s próbou odstraněn a embrya byla 4×30 min promývána v promývacím roztoku (formamid, SSC, Tween-20) při teplotě 60°C a jednou 30 min v promývacím roztoku naředěném MABT (1×MAB + 0,1% Tween-20) v poměru 1:1. Poté byly zkumavky ponechány k vychladnutí na pokojovou teplotu po dobu 20 min. Po vychladnutí byla embrya promyta 3×10 min v MABT na pokojové teplotě. Jako další krok byla embrya 2-3 h inkubována v blokovacím roztoku (MABT, 20% ovčí sérum, 2% BBR; 3:1:1). Po 2-3 h byl blokovací roztok nahrazen za nový a byla do něj přidána protilátka anti-DIG (Roche, 1:3000) v koncentraci 2 μ l/1ml a ponechána ve 4°C přes noc. Další den byla protilátka odstraněna a vzorky byly promyty 6×30-60 min v roztoku MABT a znovu byly ponechány přes noc ve 4°C. Další den byly vzorky promyty 3×20 min v roztoku NTMT (0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl₂; 0,1% Tween-20). Poté byl chromogenní signál vyvíjen ve tmě v roztoku BM purple (Roche), který byl předtím centrifugován 5 min při rychlosti 3000 rpm.

2.3 Chemická inhibice receptorů kyseliny retinové

Embrya se vyvíjela v médiu podle Steinberga (34 g NaCl; 0,5 g KCl; 0,8 g Ca(NO₃)₂·4H₂O; 2 g MgSO₄·7H₂O; 6 g tris na 1l dH₂O; pH=7,5) (Brothers, 1977) v teplotě 23°C po dobu maximálně 12 dní od stádia 35. Fenotyp inhibovaných embryí byl analyzován pomocí stereomikroskopu, skenovací elektronové mikroskopie, fluorescenční imunohistochemie, in situ hybridizace mRNA a barvení alciánovou modří.

2.3.1 Příprava roztoků inhibitorů

Látka BMS493 (5 mg; Sigma B6688; 404,5 g/mol) byla naředěna do koncentrace 5 mM přidáním 2480 μ M DMSO k 5 mg pevné látky. AGN193109 (5 mg; Sigma SML2034; 392,49 g/mol) byla naředěna přidáním 2548 μ M DMSO na 5mM a AGN194310 (5mg; Sigma SML2665; 392,49 g/mol) byla naředěna ve 2950 μ l DMSO na 4 mM s použitím

sonikátoru. Látka CD437 (5 mg; Sigma C5865; 398,49 g/mol) byla naředěna ve 2510 μ M DMSO do koncentrace 5 mM. Látka AM580 (5 mg; Sigma C5865; 351,44 g/mol) byla naředěna ve 1423 μ M DMSO do koncentrace 10 mM. Látka TTNPB (5 mg; Sigma T3757; 348,48 g/mol) byla naředěna ve 1435 μ M DMSO do koncentrace 10 mM.

2.4 Imunohistochemie

Za účelem prokázat přítomnost svalové a nervové tkáně v indukovaných vnějších žábřácích bylo provedeno protilátkové barvení kosterních svalů a periferních nervů. Protilátkové barvení bylo provedeno podle upravené podoby protokolu, který publikovali Smith & Armstrong (1990). K barvení svalů byla použita primární protilátka 12/101 (DSHB), standardní marker kosterních svalů obojživelníků (Kintner & Brockes, 1984), (Kintner & Brockes, 1985). K barvení nervů byla použita protilátka anti-myelin (GeneTex, GTX76114). Vzorky fixované přes noc v 4% PFA při teplotě 4°C byly převedeny do methanolu v němž byly dlouhodobě skladovány při teplotě -21°C. Před barvením byly vzorky převedeny do PBS a poté několikrát promyty 3×15 min roztokem 0,4% tritonu v PBS. Následně byly vzorky inkubovány minimálně 1h ve 4% BSA a 0,4% tritonu v PBS. Inkubace v primární protilátce byla provedena ve 4°C po dobu minimálně 48h v případě 12/101 a minimálně 7 dní v případě anti-myelinu. Po skončení inkubace byla primární protilátka nahrazena sekundární protilátkou rozpuštěnou ve stejném roztoku jako primární protilátka a následně byla znovu odmyta roztokem 0,4% tritonu v PBS (3×15 min). V obou případech byla použita fluorescenční sekundární protilátka Alexa Fluor 594. Snímky byly pořízeny pomocí stereomikroskopu Zeiss Lumar.V12.

2.5 Elektronová mikroskopie

Snímky byly pořízeny na elektronovém mikroskopu JEOL 6380 LV. Vzorky byly fixovány ve 4% PFA v PBS přes noc ve 4°C. Poté byly vzorky vysušeny metodou kritického bodu CO₂ v přístroji CPD 030 a pokoveny v naprašovacím zařízení Bal-Tec SCD 050.

2.6 Barvení skeletu alciánovou modří

Embrya axolotla byla barvena po dobu minimálně 48 h v barvicím roztoku sestávajícího z bezvodného etanolu a kyseliny octové (4:1), ve kterém bylo rozpuštěno 0,0015 g alciánové modří na 100 ml. Po nabarvení byla embrya depigmentována v 0,75% peroxidu vodíku pod osvětlením, neutralizována přes noc v 1% boraxu (1 g boraxu na 100 ml dH₂O) a

převedená do roztoku 0,5% KOH (0,5 g KOH na 100 ml dH₂O) a glycerolu v poměru 1:1. V roztoku KOH byla buď embrya ponechána k zprůhlednění, anebo byly měkké tkáně rozloženy v roztoku 0,3% trypsinu v 1% boraxu (Sigma T4799). V některých případech byl depigmentační krok v peroxidu vodíku vynechán. Ve většině případů byly horní čelist, neurokranium a chondrokranium odstraněny. Vypreparovaný a nabarvený hyobranchiální skelet byl poté fotografován standardním způsobem běžným v literatuře.

3 Výsledky

3.1 Exprese genů pro metabolismus kyseliny retinové

3.1.1 *Raldh2*

Na embryích bylo pozorováno několik jasných oblastí exprese *Raldh2*. *Raldh2* je exprimován především v trupových somitech, v základech končetin a v oblasti formujícího se ústního otvoru (tabule 1, 2 a 3). Trupová zóna exprese má anteriorní okraj přibližně na přechodu trupu a hlavy, to znamená, že oblast syntézy kyseliny retinové končí v místě přechodu mezi faryngem trupem. Je proto možné, že posteriornější faryngové oblouky jsou vystaveny vyšší koncentraci kyseliny retinové než anteriornější oblouky. V samotných faryngových obloucích není až do stádia 35 registrovatelný signál *Raldh2* (tabule 2 a 3). Od stádia 36 však začíná být signál *Raldh2* patrný jednak na ventrální straně každé vnější žábry a jednak na růstové špičce každé vnější žábry (Tabule 4). Je proto možné, že během vyrůstání vnějších žaber funguje mechanismus dorsoventrální polarizace orgánu, která je určena produkcí kyseliny retinové na ventrální straně a degradací kyseliny retinové na dorsální straně.

3.1.2 *Cyp26b*

S použitím próby proti mRNA genu *Cyp26b* vyrobené podle postupu popsaného v sekci 2.2.1.1 byly získány snímky zobrazující konzistentí a opakovatelné barvení pomocí chromogenní in situ hybridizace. Je proto možné tyto výsledky považovat za spolehlivou vizualizaci exprese studovaného genu. Exprese genu *Cyp26b* byla zjištěna přibližně od stádia 30 (Tabule 9) do stádia 39 (Tabule 7). Tento výsledek by poukazoval na to, že v základech vnějších žaber dochází k endogenní inhibici signalizace kyseliny retinové. Exprese *Cyp26b* je během těchto stádií detekovatelná v několika oblastech. Transkript *Cyp26b* se objevuje v mandibulární oblouku, kde se objevuje charakteristický vzor ve tvaru pís-

mene "V". Kromě toho, je *Cyp26b* viditelný uvnitř rombencefala a především v základech vnějších žaber. Ze začátku je *Cyp26b* exprimován v žaberních štěrbinách (Tabule 9). Později, během samotné iniciace vnějších žaber, je exprese *Cyp26b* registrovatelná uvnitř každého branchiálního oblouku, na němž se později vyvíjí vnější žábra, tj. v prvním, druhém a třetím oblouku a v základech vnějších žaber jako takových (tabule 8 a 6). Ani v jediném případě nebyla registrovaná přítomnost transkriptu *Cyp26b* ve čtvrtém, posledním, branchiálním oblouku. V základech vnějších žaber je také *Cyp26b* zřejmě lokalizován dorsálně.

3.1.3 *Rarβ*

In situ hybridizace genu *Rarβ* (Tabule 9) ukázala konzistentní výsledky představované zónou exprese v oblasti rombencefala, což odpovídá lokalizaci exprese v obdobných stádiích (st.33 a st.34) *Xenopus laevis* (Escriva et al., 2002). Exprese *Rarβ* ale není patrná v základech faryngových oblouků a vnějších žaber. Tento gen proto nejspíš není relevantní pro vývoj vnějších žaber faryngeálního aparátu.

3.2 Chemická inhibice receptorů kyseliny retinové

3.2.1 Efekt na vnější žábry

Celkem je v této práci zdokumentováno devět experimentů s chemikáliemi ovlivňujícími signální dráhu kyseliny retinové. Jednotlivé experimenty jsou shrnuty v Tabulce 1. Za účelem prokázat vliv kyseliny retinové na vývoj faryngeálního aparátu axolotla byly nejprve testovány specifické inhibitory jednotlivých receptorů kyseliny retinové a také syntetický analog kyseliny retinové TTNPB. AM580, specifický inhibitor RAR α , se ukázal ve všech koncentracích (2,5 μ M) jako bezprostředně letální. Zrovna tak byl letální TTNPB v koncentraci 50 μ M.

Později byl v rámci experimentu 1 (Tabule 10) testován specifický inhibitor RAR γ , CD437, společně s AGN193109, obecným inhibitorem všech tří receptorů RAR. Tabule 10, A ukazuje fenotypy embryí vystavených CD437 a fenotyp embryí vystavených AGN193109 (Tabule 10, B). U embryí vystavených CD437 (0,1 μ M) byla po 6 dnech pozorována pouze nespecifická deformace vnějších žaber, zatímco v případě AGN193109 (12,5 μ M) byla v několika případech (n=13) patrná struktura nacházející se posteriorně od třetího páru vnějších žaber. Další experimenty s chemikáliemi, u nichž nebyla nalezena bezpečná koncentrace, nebyly provedeny a výzkum zdokumentovaný v této práci se z důvodu omezeného

množství materiálu dále soustředil na inhibitory, které vyvolaly pozorovatelný fenotyp, to znamená inhibitory všech tří receptorů kyseliny retinové.

Následující experiment (experiment 2) s chemickou inhibicí receptorů kyseliny retinové byl proveden pomocí inhibitoru AGN193109 v koncentraci 12,5 μM rovněž ve stádiu 35, ale tentokrát po dobu 12 dní. Při vyhodnocování experimentu byla stejně jako v experimentu 1 v několika případech ($n=9$) opět pozorována struktura nacházející se posteriorně od třetího žaberního oblouku (Tabulka 11). Tato struktura byla aspoň na jedné straně pozorována v 69,3% případů. Při bližším zkoumání pomocí skenovací elektronové mikroskopie vyšlo najevo, že se jedná o strukturu, která topologicky odpovídá pozici čtvrtého páru vnějších žaber (Tabule 12). Na struktuře se ale nenacházejí žaberní filamenty ani žádné další vnější znaky. Ani ze snímků pořízených pomocí skenovacího elektronového mikroskopu však není jasné, zdali se anteriorně od indukované struktury nachází také žaberní štěrbina oddělující čtvrtý branchiální oblouk od třetího.

Experiment s použitím AGN193109 byl následně znovu replikován na větším vzorku ($n=62$) jako experiment 3. Embrya byla znovu analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. V tomto experimentu bylo pozorováno 24 případů unilaterální struktury a 22 případů bilaterální struktury. Celkově tak byla aspoň na jedné straně indukována ektopická struktura v 74,2% případů. Mezi fenotypy jednotlivých embryí přitom existuje určitý rozptyl. V některých případech byla indukována struktura bez jakýchkoli vnějších znaků podobná struktuře zdokumentované v prvních dvou experimentech (Tabule 13, B). Byl ale nalezen také případ, kdy se na struktuře v pozici čtvrté žábry nacházel výrůstek připomínající základ žaberního filamentu (Tabule 14).

Dále byla studována otázka, zdali i ostatní molekuly vyvinuté jako specifické inhibitory všech receptorů kyseliny retinové (kapitola 1.2.1) mají stejný efekt na vývoj vnějších žaber jako AGN193109. V experimentu 4 (Tabulka 1) s chemickou inhibicí byly použity látky BMS493 a AGN194310. BMS493 byl použit ve třech různých koncentracích: 5 μM , 7,5 μM a 17,5 μM . AGN194310 byl použit ve dvou koncentracích: 0,8 μM a 1,6 μM . To v praxi znamená, že 2 a 4 μl 4 mM roztoku AGN194310 v DMSO byly rozpuštěny v 10 ml Steinbergova roztoku (oddíl 2.1). Jako kontrolní skupina byl v obou případech použit 0,2% roztok DMSO. Po použití BMS493 byla registrována struktura podobná vnější žábře na čtvrtém branchiálním oblouku minimálně v 80% případů (Tabule 15) a ve skupině vystavené 7,5 μM BMS493 se aspoň na jedné straně vyskytuje ve 100% případů. Ojedinele se na této struktuře nacházejí také žaberní filamenty. AGN194310 v koncentraci 0,8 μM indukuje ektopickou strukturu ve 14 ze 17 případů a v koncentraci 1,6 μM v 8 z 10

případů. Skenovací elektronové mikrografie (Tabule 16) ukazují, že se jedná o skutečnou vnější žábru, která stejně jako u normální žábry vykazuje anteroposteriorní polarizaci přičemž se na posteriorní straně vyvíjejí dvě řady žaberních filament. Ektopická žábra je zřetelně oddělena od žábry třetího páru, což není ještě patrné v experimentech 1, 2 a 3 (tabule 10, 12, 14).

Koncentrace, které byly shledány jako efektivní v experimentu 4 byly znovu použity při experimentu 5 na větším vzorku ($n=26$) v případě BMS493 (Tabule 17) a $n=30$ v případě AGN194310 (Tabule 18). V této koncentraci je efekt AGN194310 vzhledem k přítomnosti žábry čtvrtého páru 100%, ale je patrný značný defekt všech vnějších žaber. Tabule 18 zachycuje čtyři různé fenotypy získané inhibicí receptorů RAR pomocí AGN194310 a Tabule 19 ukazuje velmi podobný fenotyp vizualizovaný pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Defekt vnějších žaber je velmi silný a nevznikají žaberní filamenty ani růstová špička.

Následoval experiment 6, při němž byla embrya ($n=5$) ponechána v roztoku inhibitorů v ověřené koncentraci $1,6 \mu\text{M}$ a byla kontrolována každých 24 h. Přítomnost vnější žábry byla registrována už po 72 h od začátku experimentu. Tato embrya byla fixována a použita na skenovací elektronovou mikroskopii (Tabule 20). Na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu jsou zřetelné základy vnějších žaber vznikající po 3 dnech. Tento výsledek by nasvědčoval tomu, že pro indukci čtvrté žábry postačují 3 dny inhibice receptorů kyseliny retinové.

V návaznosti na experiment 6 byl proveden experiment 7, při němž byla embrya ponechána v AGN194310 v koncentraci $1,6 \mu\text{M}$ pod dobu 4 dnů a byla použita na in situ hybridizaci genů *Cyp26b* a *Raldh2*, které byly předtím studovány na normálních embryích. In situ hybridizace ukazuje přítomnost genové exprese *Cyp26b* v indukovaných základech vnějších žaber (Tabule 21) a také ve vznikající růstové špičce embryí v pokročilejším stádiu vývoje (Tabule 22). Tyto výsledky poukazují nejen na to, že by pro iniciaci vnější žábry na čtvrtém oblouku mohly postačovat pouzete 3 dny strávené v roztoku inhibitoru, ale také na to, že se vývojový program určující vývoj žábry na čtvrtém branchiálním oblouku nezastaví po odstranění inhibitorů.

Na základě výsledků Experimentů 6 a 7 byl proveden experiment 8 při němž byla v různých experimentálních skupinách embrya ponechána v $1,6 \mu\text{M}$ roztoku po dobu 3, 4, 5, 6 a 12 dní. Po daném počtu dní byl roztok inhibitoru vyměněn za roztok 0,2% DMSO. V souladu s předchozími výsledky byla čtvrtá žábra iniciována už po třech až čtyřech dnech strávených v roztoku inhibitoru (Tabule 26). V několika případech se také

podářilo zachytit na snímku ze skenovacího elektronového mikroskopu žaberní šterbinu nacházející se mezi indukovanou čtvrtou žábrou a žábrou třetího páru (Tabule 25, 27, 29). Embrya ve všech experimentálních skupinách vykazovala fenotyp vnější žábry na čtvrtém branchiálním oblouku s velmi podobnou četností, a to prakticky ve všech případech (Tabule 23) podobně jako v předchozím experimentu (experiment 5) se stejnou koncentrací AGN194310. Z výsledků tohoto experimentu je však zřejmé, že defekt vnějších žaber je opět větší v experimentálních skupinách, které byly vystaveny působení inhibitorů po dobu celých 12 dní (Tabule 24 a 25), než ve skupinách, které byly vystaveny inhibitorům po dobu 3-6 dní. V ojedinělých případech se také u embryí, která od stádia 35 strávila 3-6 dní v roztoku inhibitoru, vyskytuje předčasně se vyvíjející přední končetina (Tabule 28), která zároveň obsahuje skeletální koncentrace chondrocytů barvitelných alciánovou modří (Tabule 33, B). Takovýto základ končetiny nebyl zaznamenán u embryí, který byla vystavena inhibitoru AGN194310 po celých 12 dní (Tabule 24 a 25). Defekt vnějších žaber a filamentů je v této skupině výraznější, ačkoli méně markantní, než u předchozího experimentu 5 (Tabule 18 a 19).

Na základě pozorování, že intenzivnější inhibice vede k defektu vnějších žaber byl navržen experiment 9, v němž byla embrya vystavena koncentraci 1,8 μM , to znamená zvýšené koncentraci oproti předchozím experimentům, po dobu 4 dnů, po které byl roztok inhibitorů opět odstraněn a nahrazen 0,2% DMSO. Tabule 30 ukazuje fenotyp embryí u nichž se vývoj vnějších žaber zastavil ve stádiu iniciace a znovu se obnovil po odstranění inhibitoru. Pokud byla embrya ponechána v roztoku inhibitorů pouze 4 dny, tak došlo k obnovení vyrůstání aspoň jedné vnější žábry v 10 z 18 případů, zatímco ve skupině, která byla inhibitorům vystavena po celých 12 dní, byl zaznamenán pouze jeden takový případ z osmi embryí (Tabule 30, B). Na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu (Tabule 30, A) je jasně patrný předěl mezi částí vnější žábry, která vzniká i za přítomnosti inhibitorů a částí vznikající po jejich odstranění.

3.2.2 Protílátkové barvení struktur ve vnějších žábrách

Embrya z experimentu 5 byla použita na protílátkové barvení pomocí primární protílátky 12/101, běžně používané protílátky pro značení kosterních svalů (Griffin et al., 1987), (Kintner & Brockes, 1984), (Kintner & Brockes, 1985). Pomocí protílátky 12/101 byly značeny tkáně embryí vystavených inhibitorům AGN194310 (1,6 μM) a BMS493 (7,5 μM). Na základě výsledků protílátkového barvení je možné soudit, že indukované žábry stejně

jako normální žábry obsahují svaly *m. levatores et depressores branchiarum* (Tabule 40) popsané v dřívějších publikacích (Ericsson & Olsson, 2004) (Ziermann & Diogo, 2013) (Schwarz et al., 2023). Barvení nervů pomocí protilátky proti myelinu ukázalo přítomnost signálu ve čtvrté vnější žábře (Tabule 41). Vizualizace těchto dvou tkání podporuje tvrzení, že se jedná o pravou vnější žábru.

3.2.3 Barvení hyobranchiálního skeletu alciánovou modří

Po provedení experimentů s inhibicí kyseliny retinové, které opakovaně ukázaly přítomnost vnější struktury v podobně ektopického páru vnějších žaber jako následek snížené míry signalizace kyseliny retinové, byla studována otázka, zdali došlo i ke změnám v morfologii hyobranchiálního skeletu. Embrya z těchto experimentů, která nebyla použita na skenovací elektronovou mikroskopii, in situ hybridizaci nebo protilátkové barvení, byla obarvena alciánovou modří způsobem popsaným v oddílu 2.6. V případě Experimentu 3 s AGN193109 a experimentu 4 s AGN194310 a BMS493 byla početnost skeletálních fenotypů kvantifikována a zanesena do grafu. Na skeletu embryí, která byla součástí stejných experimentálních skupin jako embrya s žábrou na čtvrtém branchiálním oblouku, byly zaznamenány dva zásadní znaky, které se nevyskytují u kontrolních embryí. Jedná se o přítomnost chrupavčitého spojení mezi elementem ceratobranchiale 3 a basibranchiale a transformace skeletálního elementu ceratobranchiale 4, který je v některých případech možné popsat jako indukce ceratobranchiale 5.

Už po obarvení embryí vystavených inhibitoru v rámci experimentu 8 alciánovou modří a zprůhlednění tkání v roztoku KOH a glycerolu, aniž byly zbylé tkáně rozpuštěny v trypsinu, je patrná deformace elementu ceratobranchiale 4 (Tabule 32, 1). Tato deformace má charakter anteriorního ohybu chrupavky ceratobranchiale 4. Po rozpuštění zbylých tkání v trypsinu je patrné, že tento defekt není ojedinělý. Ve stejné experimentální skupině se podobná deformace projevuje na dalších embryích zachycených na Tabuli 32. Tato deformace se vyskytuje už po třech dnech strávených v inhibitoru AGN194310 od stádia 35 (Tabule 31), a tudíž se objevuje ve stejném časovém intervalu jako žábra čtvrtého páru. Na deformaci ceratobranchiale 4 je pozoruhodná její pravidelnost, přičemž je zřejmé, že se v jednotlivých případech jedná o různé stupně téhož procesu. V některých případech je přítomen pouze mírný anteriorní ohyb elementu (např. Tabule 32, 2-3), ve více pokročilých případech vzniká na ceratobranchiale 4 výrůstek tvořený stejně jako celý hyobranchiální skelet chondroblasty, což má za následek to, že se ceratobranchiale

4 vidlicovitě rozvětňuje jako na Tabuli 38 (1 a 2) a na Tabuli 34 (3 a 4). V mnoha případech se tento výrůstek opět napojuje na ceratobranchiale 4 čímž vzniká struktura prstenčitého tvaru (Tabule 32, 4, Tabule 33, 1 a Tabule 35, 5). Tento typ deformace postihuje pouze čtvrtý branchiální oblouk a nebyl zdokumentován případ podobné transformace u anteriornějších branchiálních oblouků. Z tohoto důvodu může být vznik této struktury považován za posteriorné extenzi hyobranchiálního skeletu. Ektopická struktura na ceratobranchiale 4 je proto v této práci označována jako ceratobranchiale 5 (cb5). Ceratobranchiale 5 se objevuje po aplikaci všech tří inhibitorů. Početnost tohoto fenotypu byla kvantifikována ve dvou případech (Tabule 39, Tabule 36). V obou kvantifikovaných skupinách jeho početnost přesahuje 50% a u experimentu 4 ve skupině vystavené BMS493 (v koncentraci 7,5 μ M) se přinejmenším jeden abnormální fenotyp vyskytuje dokonce u všech jedinců (Tabule 37 a 38).

Transformace ceratobranchiale 4, která někdy v pokročilejší podobě vede k odvětvení ceratobranchiale 5, je zároveň většinou doprovázena přítomností ektopických hypobranchiálií. Hyobranchiální skelet axolotla v normálním stavu obsahuje pouze elementy hypobranchiale 1 a hypobranchiale 2. To znamená, že pouze ceratobranchialia dvou nejvíce anteriorních branchiálních oblouků se napojují na basibranchiale (Obrázek 4, a). Po inhibici RAR ale vzniká stav, ve kterém se na basibranchiale napojuje i ceratobranchiale 3, anebo vzniká takový skeletální element přinejmenším částečně. V některých případech, např. Tabule 32 (2-4) a Tabule 33 A, 1, dosahuje tento element takové stupně vývoje, že je možné jej s jistotou označovat jako hypobranchiale 3. U těchto embryí tudíž sestává skelet třetího branchiálního oblouku ze dvou kosterních elementů podobně jako skelet prvního a druhého branchiálního oblouku. Ve dvou případech bylo také zaznamenáno plně vyvinuté hypobranchiale 4 (Tabule 38, A, 1 a 2), ale pouze v rámci experimentu s BMS493. Struktury, které by mohly být označovány jako hypobranchiale 4, se ale vyskytují i ve skeletu embryí vystavených AGN194310 a AGN193109, ačkoli se plně nenapojují na basibranchiale. V takových případech mají elementy hypobranchiale 4 buď podobu posteriorních výrůstků na hypobranchiale 3 (Tabule 33, 2 a Tabule 34, 3 a 4) nebo naopak mediálně směřujících výrůstků na ceratobranchiale 3 jako na tabulích 37 a 36, 3.

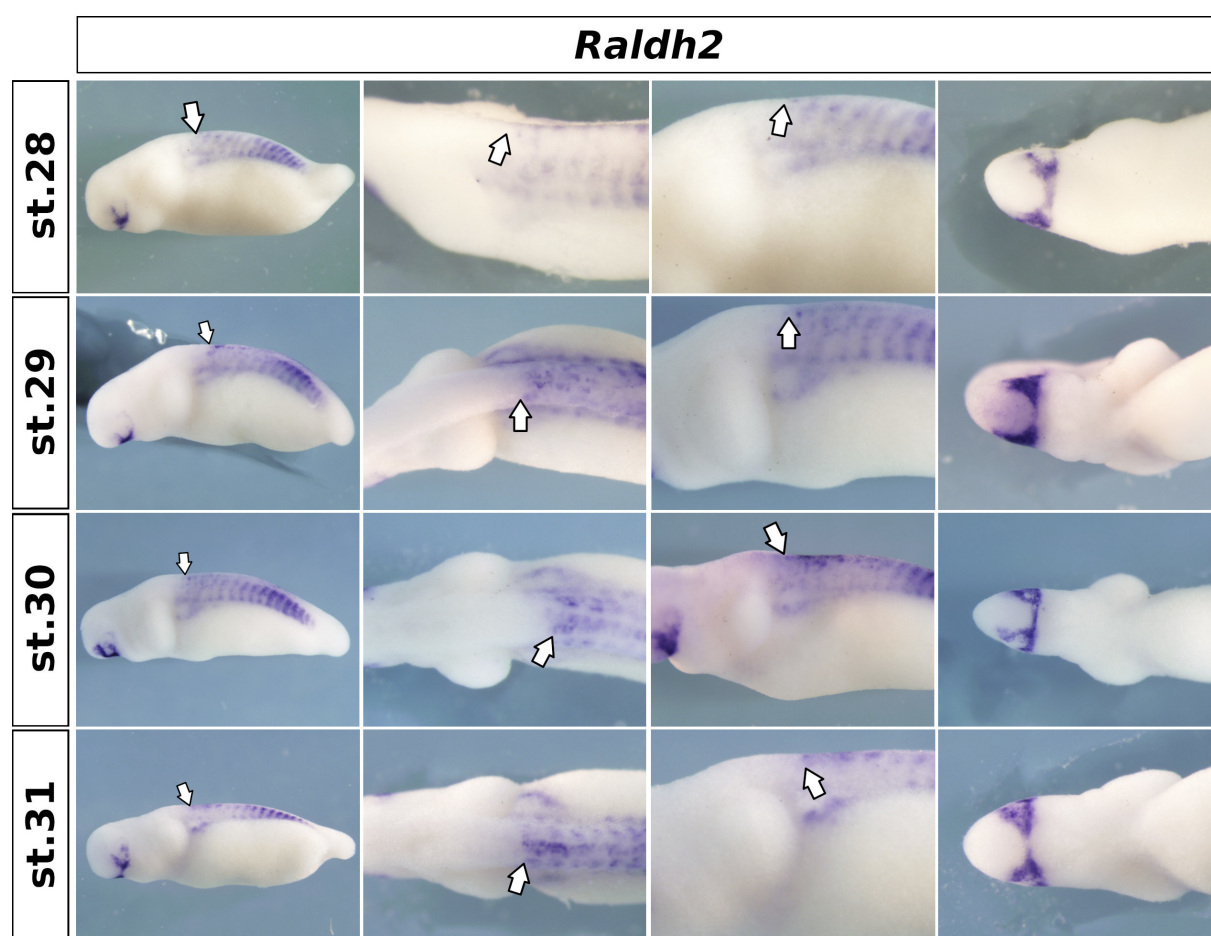
Název	Použitá látka	Popis experimentu	Obrazová dokumentace
Experiment 1	AGN193109, CD437	Embrya ve stádiu 35 byla ponechána v roztoku AGN193109 (1,25 μ M) a CD437 (0,1 μ M) po dobu 5 dní. Kontrolní skupina byla v 0,25% DMSO	Celkový fenotyp: tabule 10
Experiment 2	AGN193109	Embrya ve stádiu 35 byla ponechána v roztoku AGN193109 (1,25 μ M) po dobu 12 dní. Kontrolní skupina byla v 0,2% DMSO.	Celkový fenotyp: tabule 12.
Experiment 3	AGN193109	Embrya ve stádiu 35 byla ponechána v roztoku AGN193109 (1,25 μ M) po dobu 12 dní. Kontrolní skupina byla v 0,2% DMSO.	Celkový fenotyp: tabule 11 a 12. Hyobranchiální skelet: tabule 36.
Experiment 4	AGN194310, BMS493	Embrya ve stádiu 35 byla ponechána v roztoku AGN194310 (0,8 μ M) a BMS493 (5 μ M, 17,5 μ M, 7,5 μ M) po dobu 12 dní. Kontrolní skupina byla v 0,7% DMSO	Celkový fenotyp: tabule 15 a 16. Hyobranchiální skelet: tabule 37, 38, 39.
Experiment 5	AGN194310, BMS493	Embrya ve stádiu 35 byla ponechána v roztoku AGN194310 (1,6 μ M) a BMS493 (7,5 μ M) po dobu 12 dní.	Celkový fenotyp: tabule 17, 18, 19. Protilátkové barvení: tabule 40
Experiment 6	AGN194310	Embrya ve stádiu 35 byla ponechána v roztoku AGN194310 (1,6 μ M) po dobu 3 dní a poté byla fixována.	SEM: tabule 20
Experiment 7	AGN194310	Embrya ve stádiu 35 byla ponechána v roztoku AGN194310 (1,6 μ M) po dobu 3 dní a poté byla fixována.	ISH: tabule 21 a 22
Experiment 8	AGN194310	Embrya ve stádiu 35 byla ponechána v roztoku AGN194310 (1,6 μ M) po dobu 3 - 6 dní. V každé skupině byl po dané době roztok inhibitorů nahrazen 0,2% DMSO.	Celkový fenotyp: tabule 24,25,26,27,28,29. Hyobranchiální skelet: tabule 31, 32, 33, 34, 35.
Experiment 9	AGN194310	Embrya ve stádiu 35 byla ponechána v roztoku AGN194310 (1,8 μ M) po dobu 4 dnů a poté byl roztok inhibitoru odstraněn 0,2% DMSO. Kontrolní skupina byla 12 dní v 0,2% DMSO.	Celkový fenotyp: tabule 30. Protilátkové barvení: tabule 41

Tabulka 1: Shrnutí zdokumentovaných experimentů

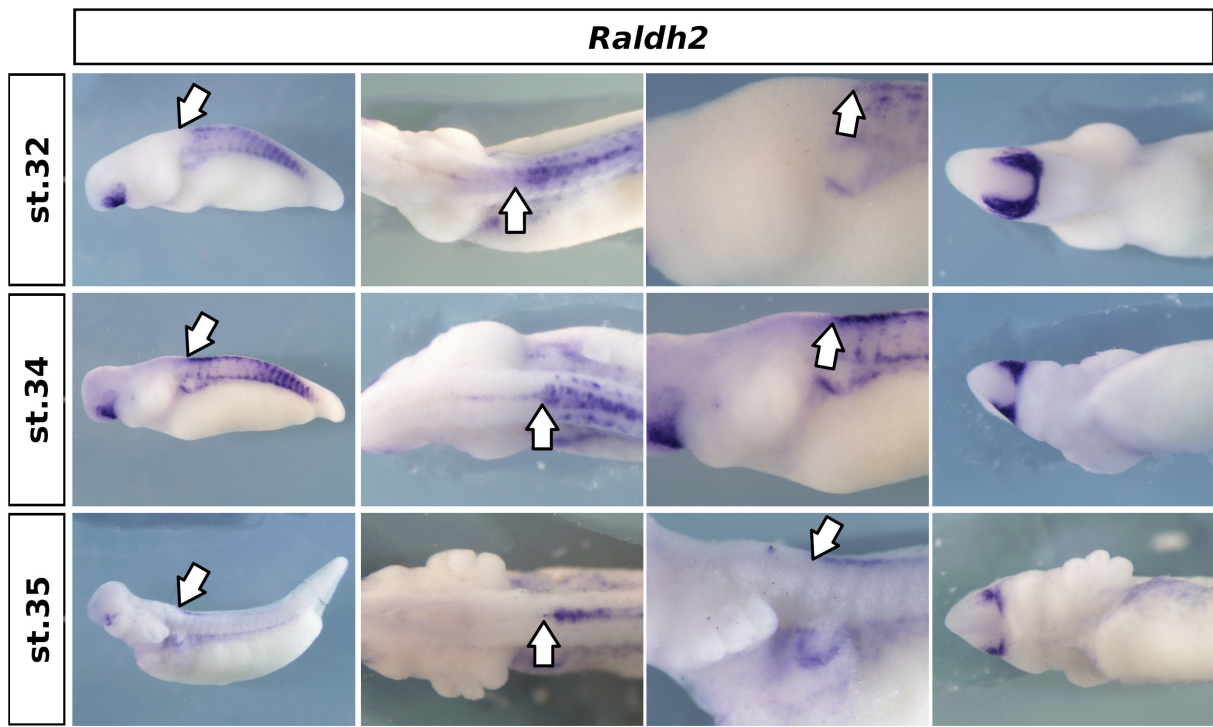
4 Obrazové tabule

4.1 Analýza genové exprese

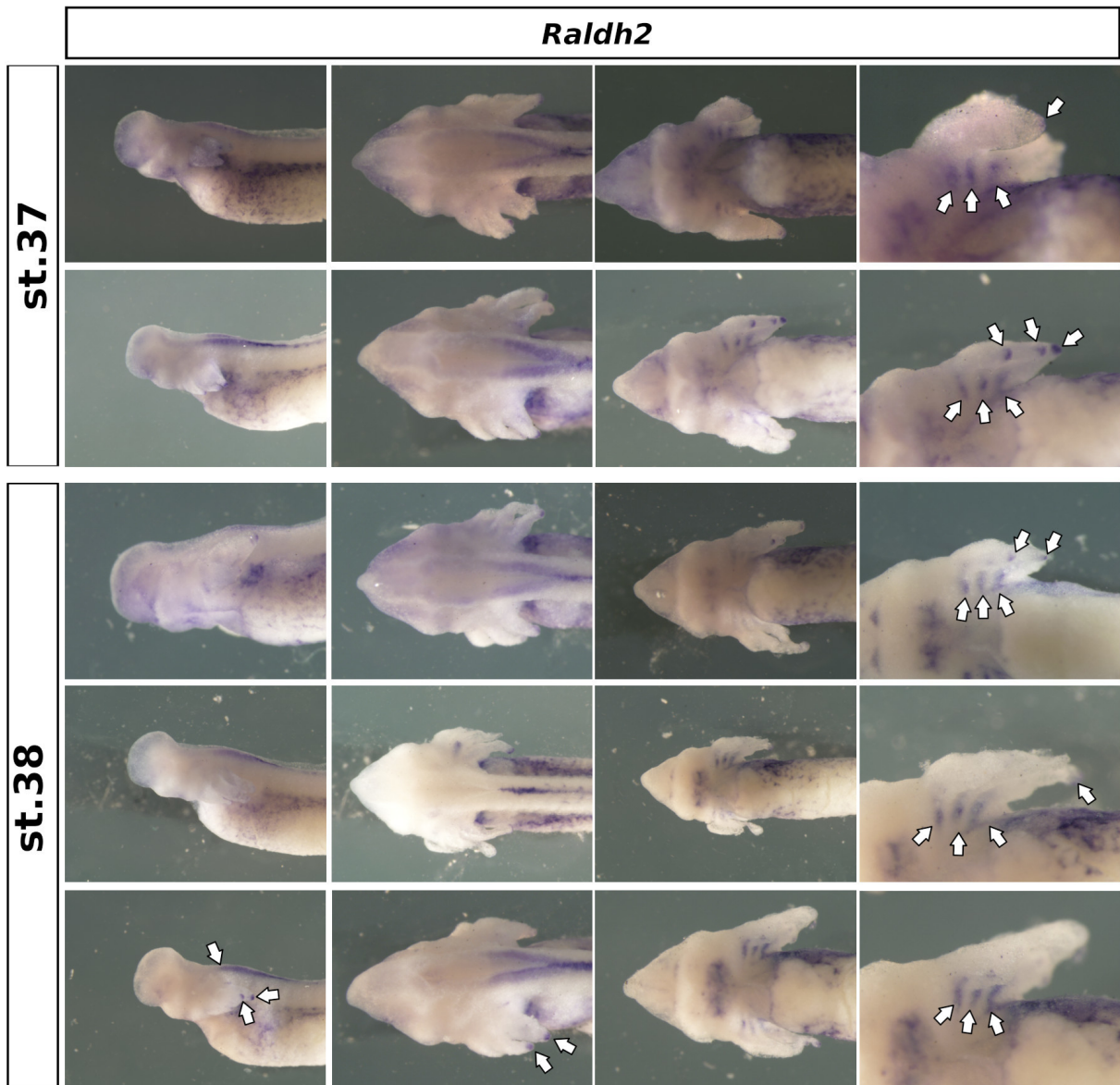
4.1.1 *Raldh2*



Tabule 1: In situ hybridizace genu *Raldh2* v mladších stádiích (1. část). In situ hybridizace genu *Raldh2* ve stádiích 28-31. Anteroposteriorní gradient v expresi genu *Raldh2* je patrný. Gen *Raldh2* kóduje enzym retinaldehyd dehydrogenázu oxidující retinaldehyd na kyselinu retinovou. V embryu je tudíž kyselina retinová syntetizována posteriorně od faryngeální oblasti, přičemž nejvíce posteriorní oblouk může být vystaven největší koncentraci kyseliny retinové, protože je k oblasti exprese genu *Raldh2* nejbliže. Po celou dobu anteriorní okraj oblasti exprese *Raldh2* dosahuje přibližně na úroveň základů předních končetin. Samotné základy končetin ve všech studovaných stádiích exprimují *Raldh2*. Šipka ukazuje anteriorní okraj exprese *Raldh2*.

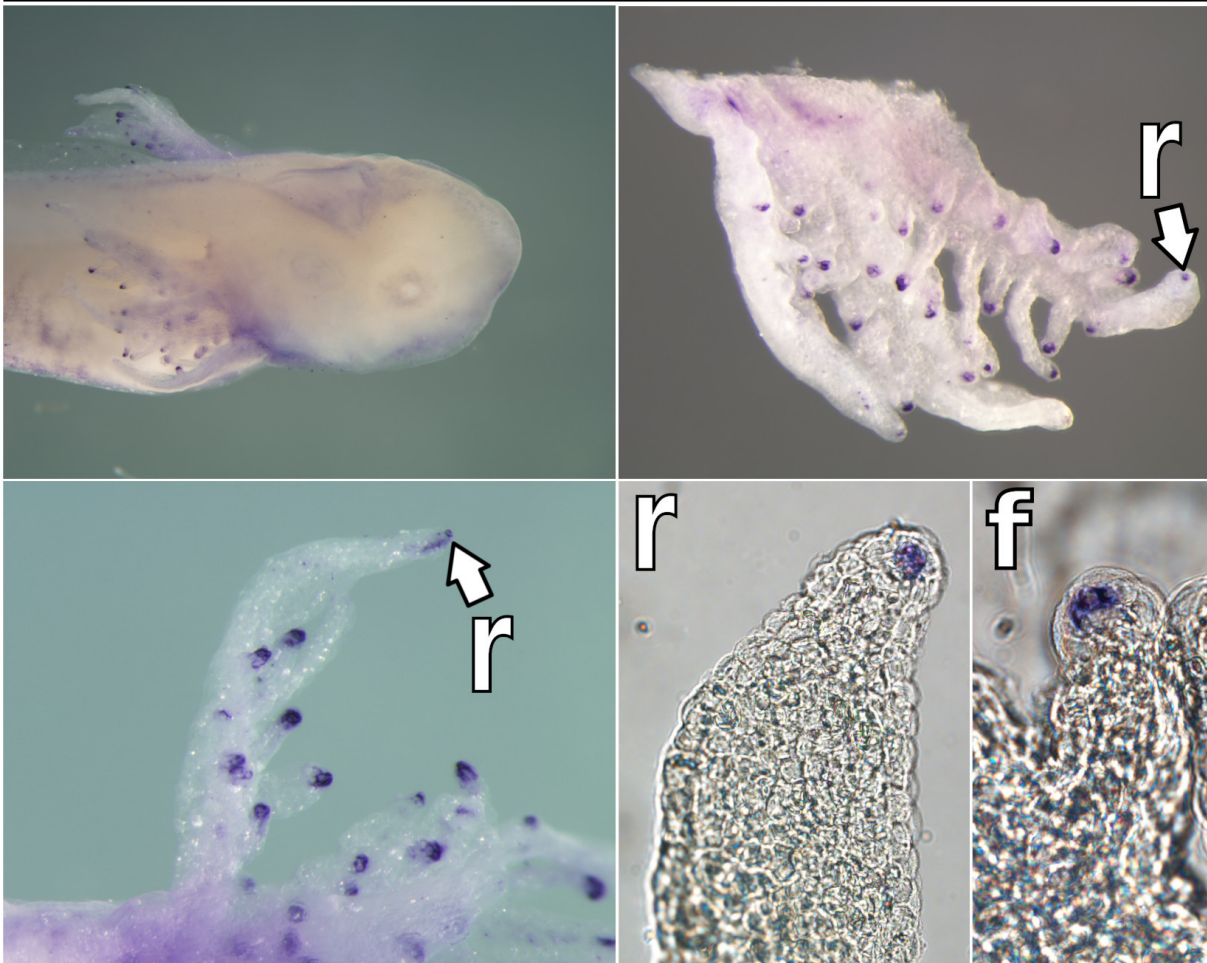


Tabule 2: In situ hybridizace genu *Raldh2* v mladších stádiích (2. část). In situ hybridizace s použitím próby proti transkriptu genu *Raldh2* ve stádiích 32, 34 a 35. Antero-posteriorní gradient v expresi genu *Raldh2* je patrný podobně jako v mladších stádiích 28-31 (Tabule 1). Šipka ukazuje anteriorní okraj exprese *Raldh2*. V základech vnějších žaber není zatím *Raldh2* aktivní.



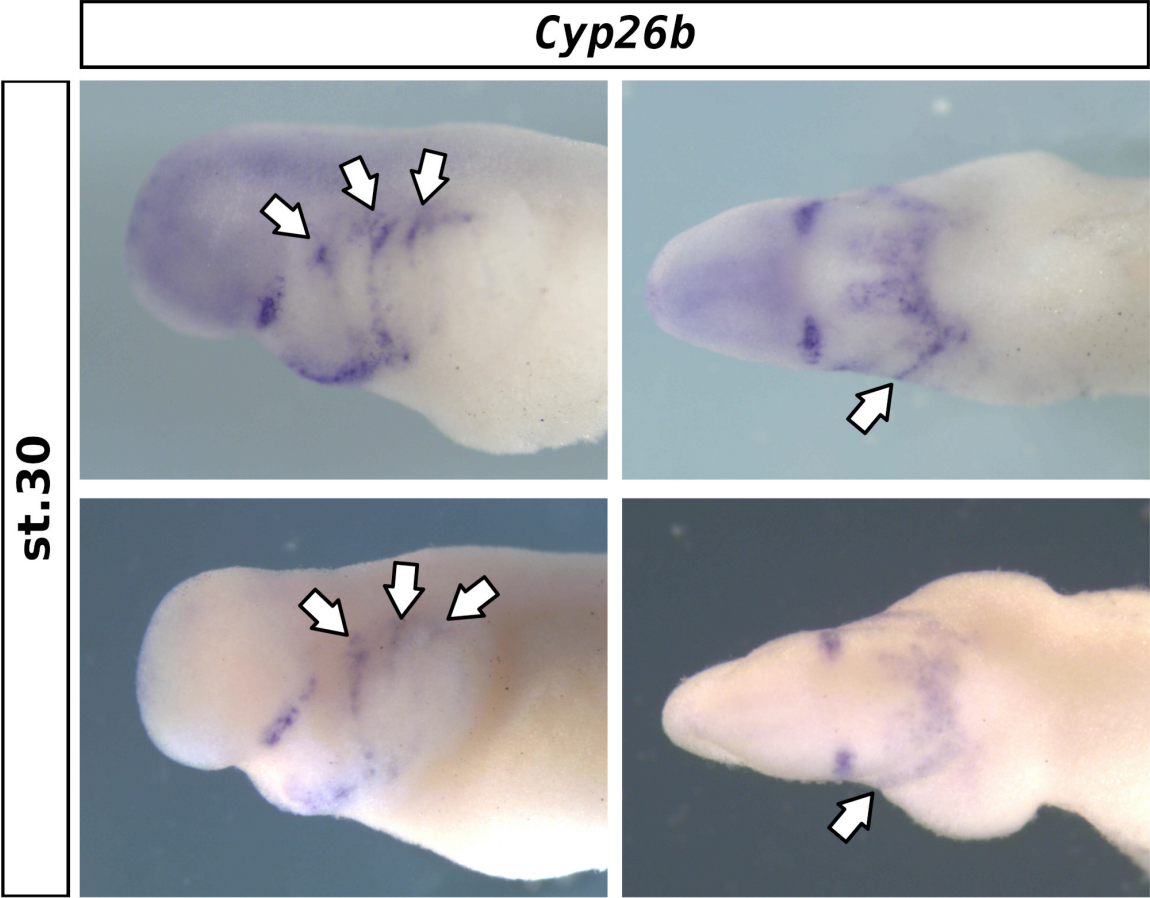
Tabule 3: In situ hybridizace s použitím próby proti transkriptu genu *Raldh2* ve stádiích 37 a 38. Anteroposteriorní gradient v expresi genu *Raldh2* je patrný. Gen *Raldh2* kóduje enzym retinaldehyd dehydrogenázu oxidující retinaldehyd na kyselinu retinovou je exprimován v trupových somitech a v těchto stádiích také na ventrální straně základu každé vnější žábry. Šipka ukazuje expresi *Raldh2* ve špičkách vnějších žaber a na ventrální straně základů vnějších žaber.

Raldh2



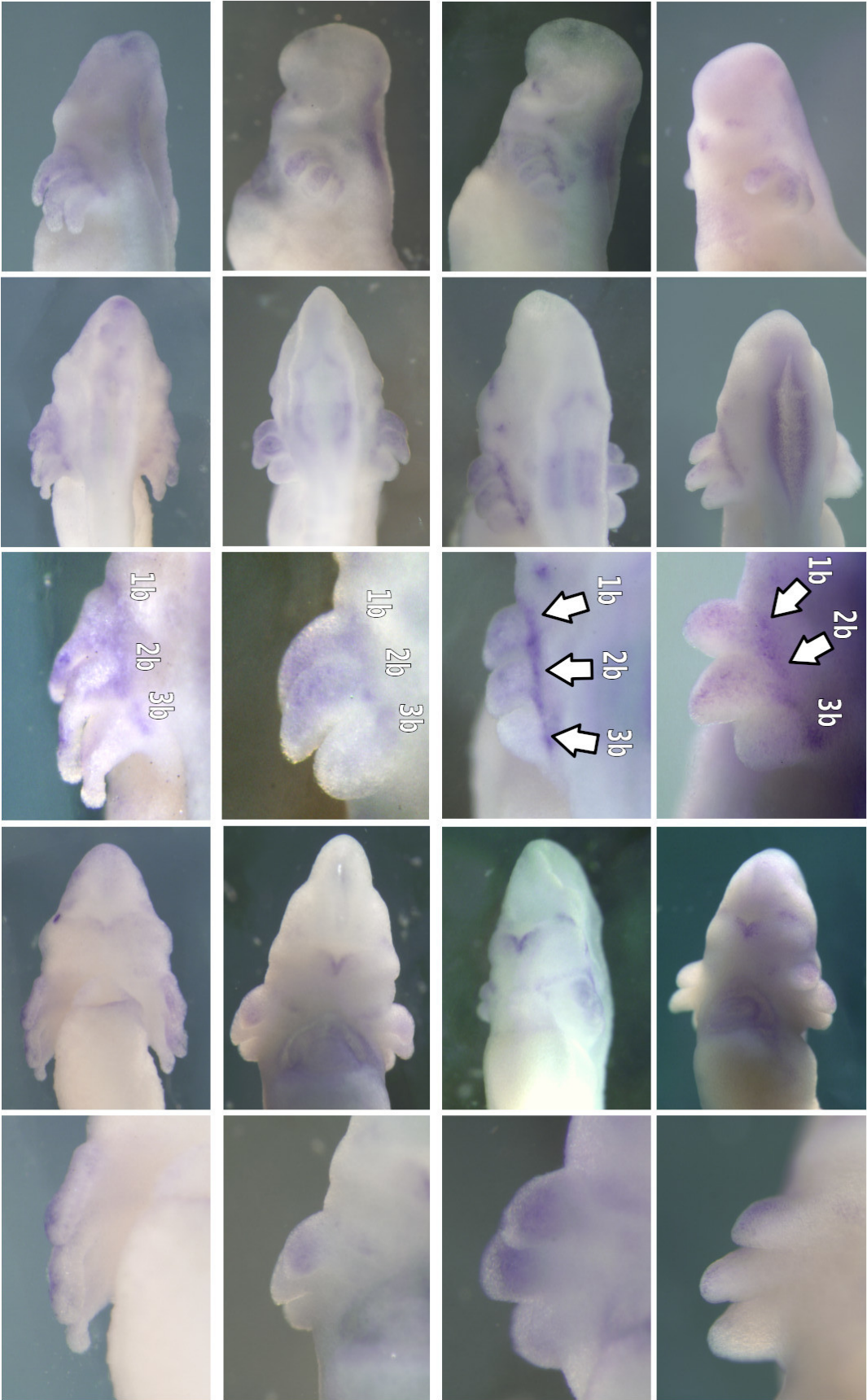
Tabule 4: In situ hybridizace RNA genu *Raldh2* ve filamentech. r - růstová špička; f -
branchiální filament. Jedinec je přibližně ve stádiu 43.

4.1.2 *Cyp26b*



Tabule 5: In situ hybridizace *Cyp26b* v mladších stádiích (1. část). *Cyp26b* je exprimován v žaberních štěrbinách jedinců ve stádiu 30.

st.37/38	st.37	st.36	
-----------------	--------------	--------------	--

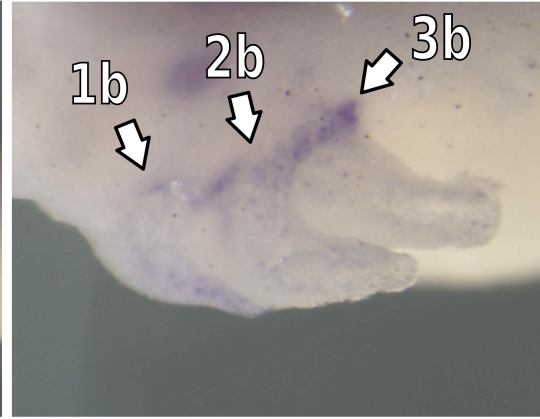
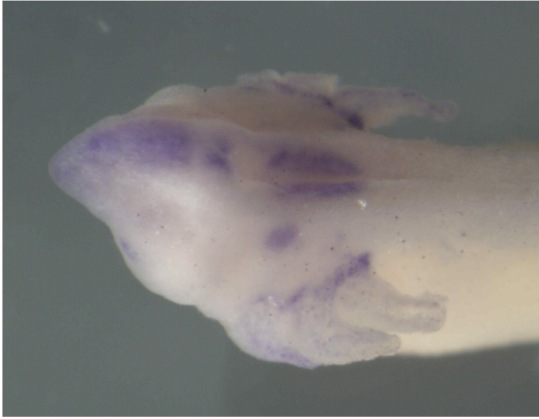


Cyp26b

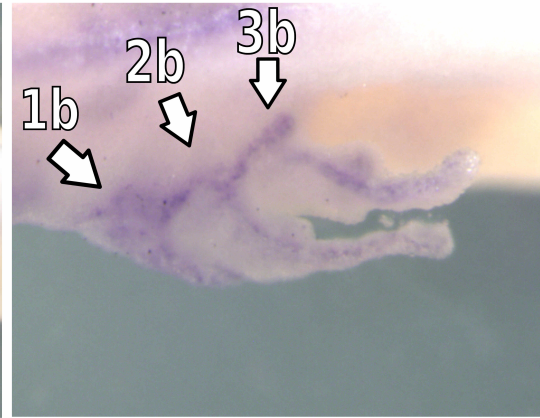
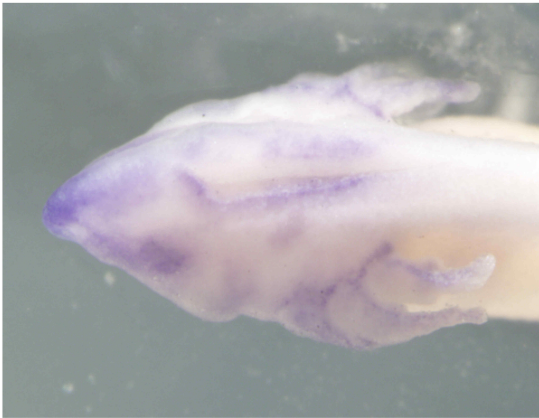
Tabule 6: In situ hybridizace *Cyp26b* v mladších stádiích (2. část). *Cyp26b* je exprimován uvnitř prvního, druhého a třetího branchiálního oblouku stádií 36-38, ale není viditelný uvnitř čtvrtého. 1b - první branchiální oblouk, 2b - druhý branchiální oblouk, 3b - třetí branchiální oblouk. V mandibulárním oblouku je patrná zóna exprese ve tvaru písmene "V".

Cyp26b

st.38



st.39



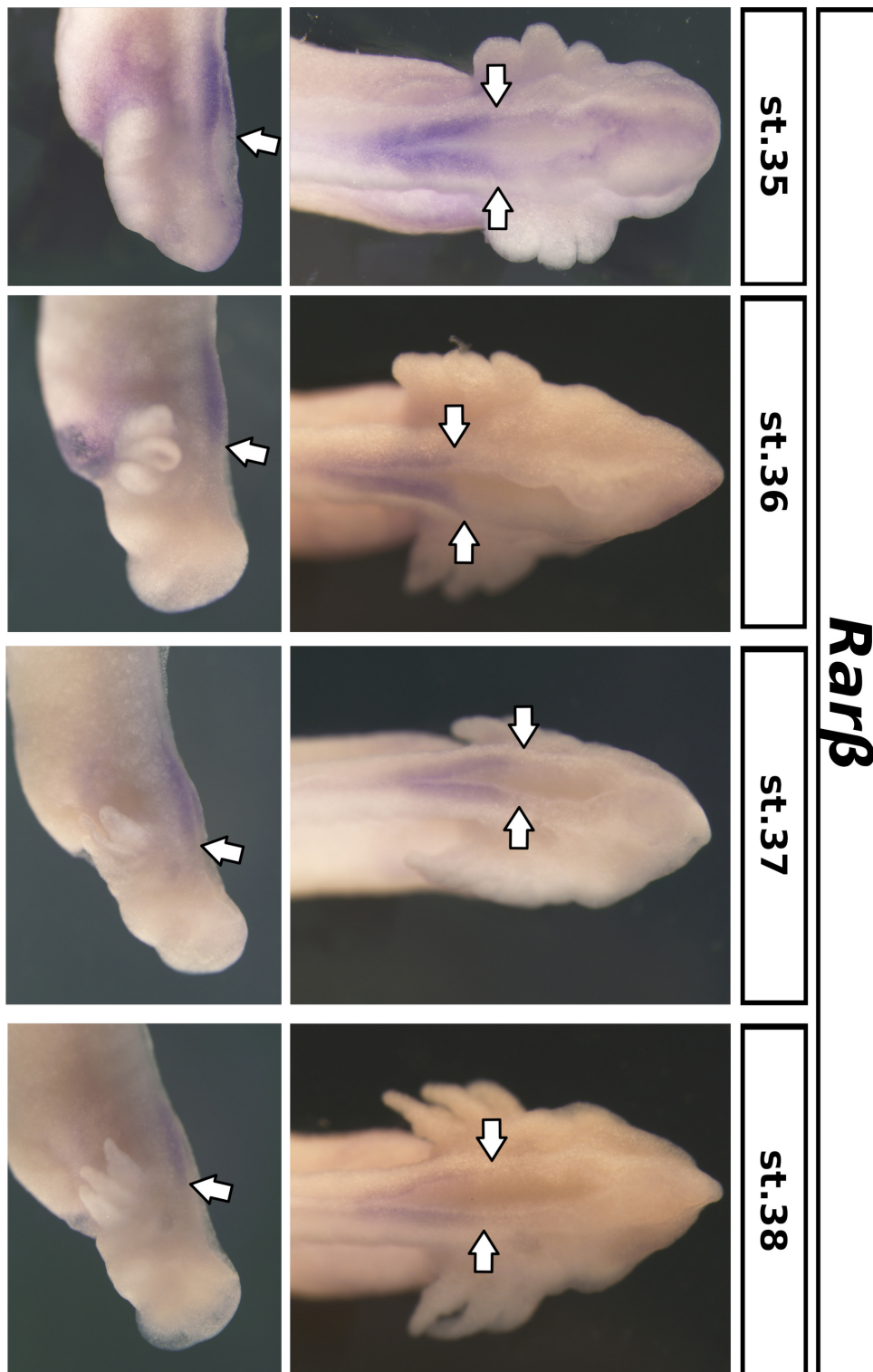
Tabule 7: In situ hybridizace *Cyp26b* ve starších stádiích 38 a 39. *Cyp26b* je exprimován uvnitř prvního, druhého a třetího branchiálního oblouku, ale není viditelný uvnitř čtvrtého. 1b - první branchiální oblouk, 2b - druhý branchiální oblouk, 3b - třetí branchiální oblouk.



Axolotl, st. 36

Tabule 8: Korelace mezi in situ hybridizací a skenovací elektronovou mikroskopií. Nahoře: hlava embrya axolotla ve stádiu 36, v němž jsou viditelné tři základy vnějších žaber. SEM) snímky základů vnějších žaber ze skenovacího elektronového mikroskopu. Dole: chromogenní in situ hybridizace s použitím próby proti mRNA genu *Cyp26b*. Základy vnějších žaber exprimují gen *Cyp26b*, a tudíž v nich dochází k inhibici signalizace kyseliny retinové. 1b - první branchiální oblouk, 2b - druhý branchiální oblouk, 3b - třetí branchiální oblouk.

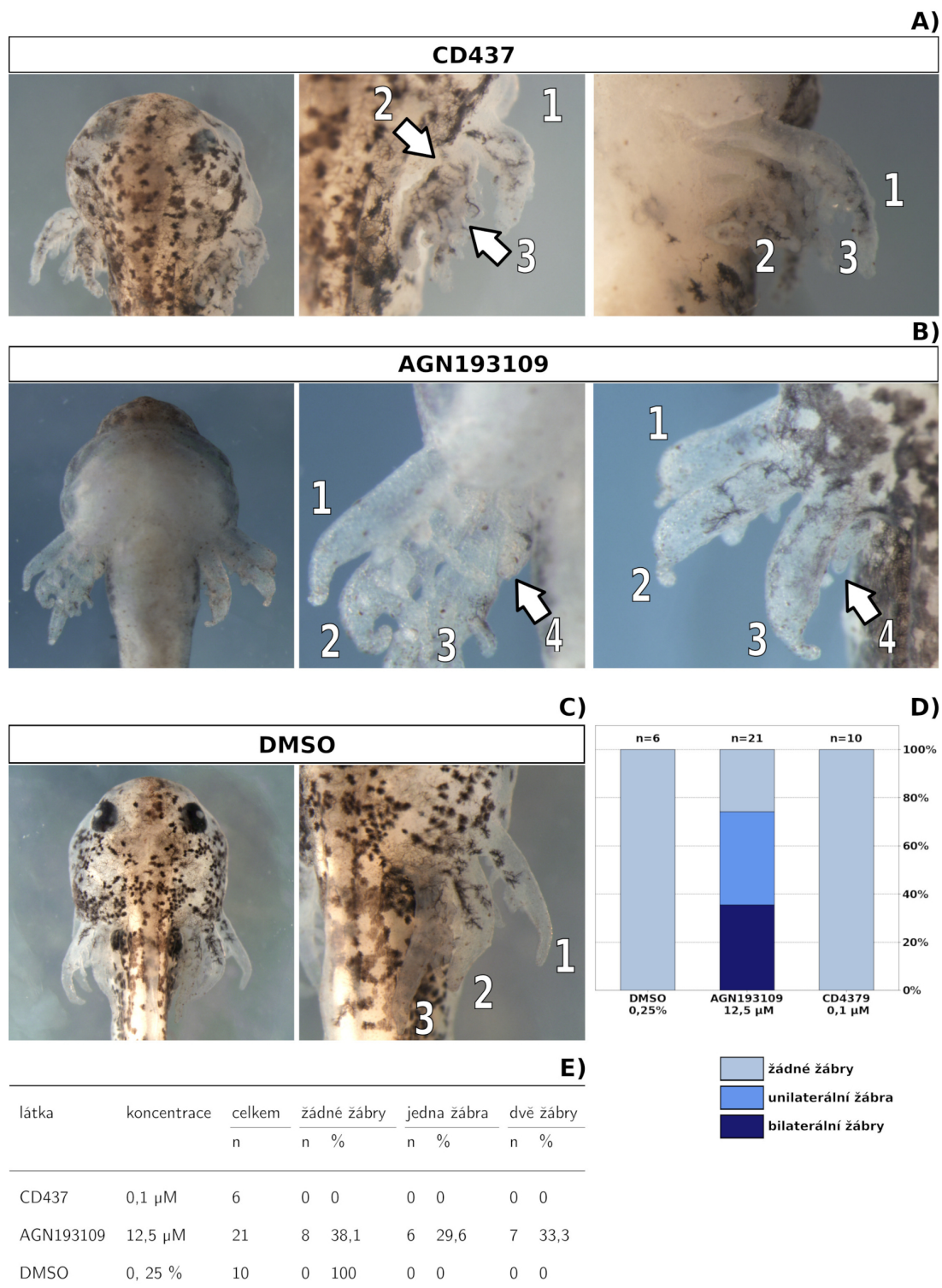
4.1.3 *Rarβ*



Tabule 9: In situ hybridizace *Rarβ*. Receptoru kyseliny retinové β je exprimován od stádia 35 do stádia 38 uvnitř rombencefala.

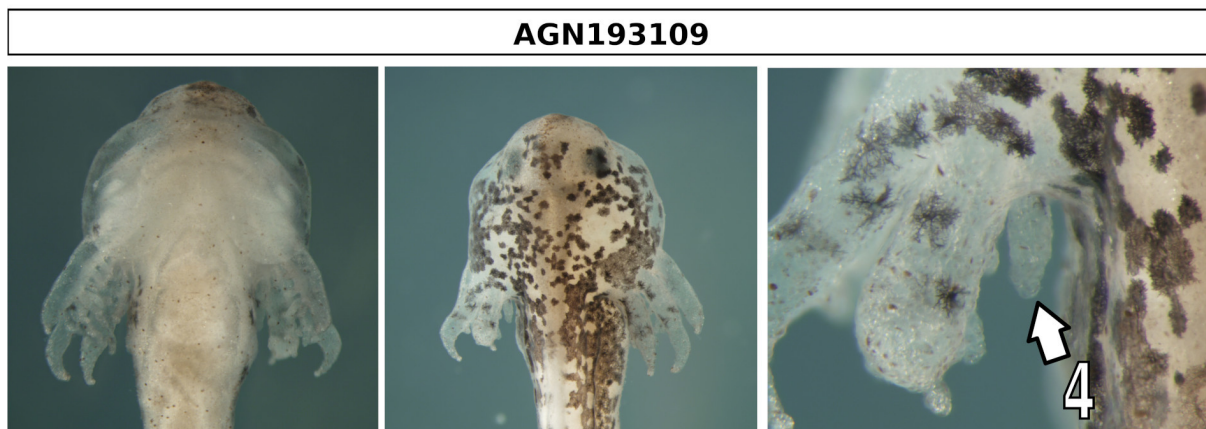
4.2 Chemická inhibice receptorů kyseliny retinové

4.2.1 Celkový fenotyp

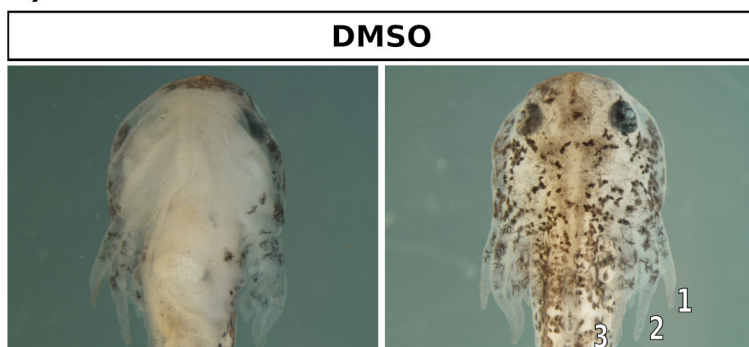


Tabule 10: Experiment 1. První experiment s použitím inhibitoru AGN193109 v koncentraci 12,5 μM po dobu 6 dnů a inhibitoru CD437 v koncentraci 0,1 μM po dobu 6 dnů. CD437 je specifický inhibitor $\text{RAR}\gamma$ a AGN193109 je obecný inhibitor všech RAR. A) - fotografie embryí vystavených CD437 ze stereomikroskopu. B) - fotografie embryí vystavených CD437. C) - kontrolní skupina v 0,25% DMSO. D) - graf. E) - tabulka četností; žádné žábry - na čtvrtém branchiální oblouku se nevyvíjí žádná struktura, jedna žábra - unilaterální struktura, dvě žábry - bilaterální struktura. 1 - Vnější žábra prvního páru, 2 - vnější žábra druhého páru, 1 - vnější žábra třetího páru, 4 - struktura vznikající posteriorně od třetího páru žaber.

A)



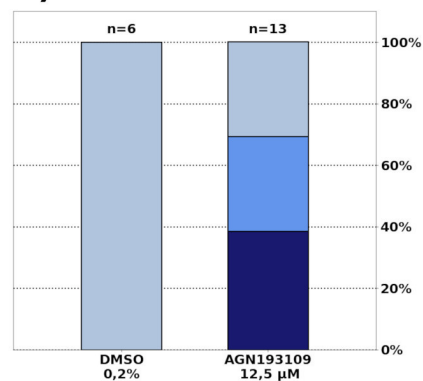
B)



C)

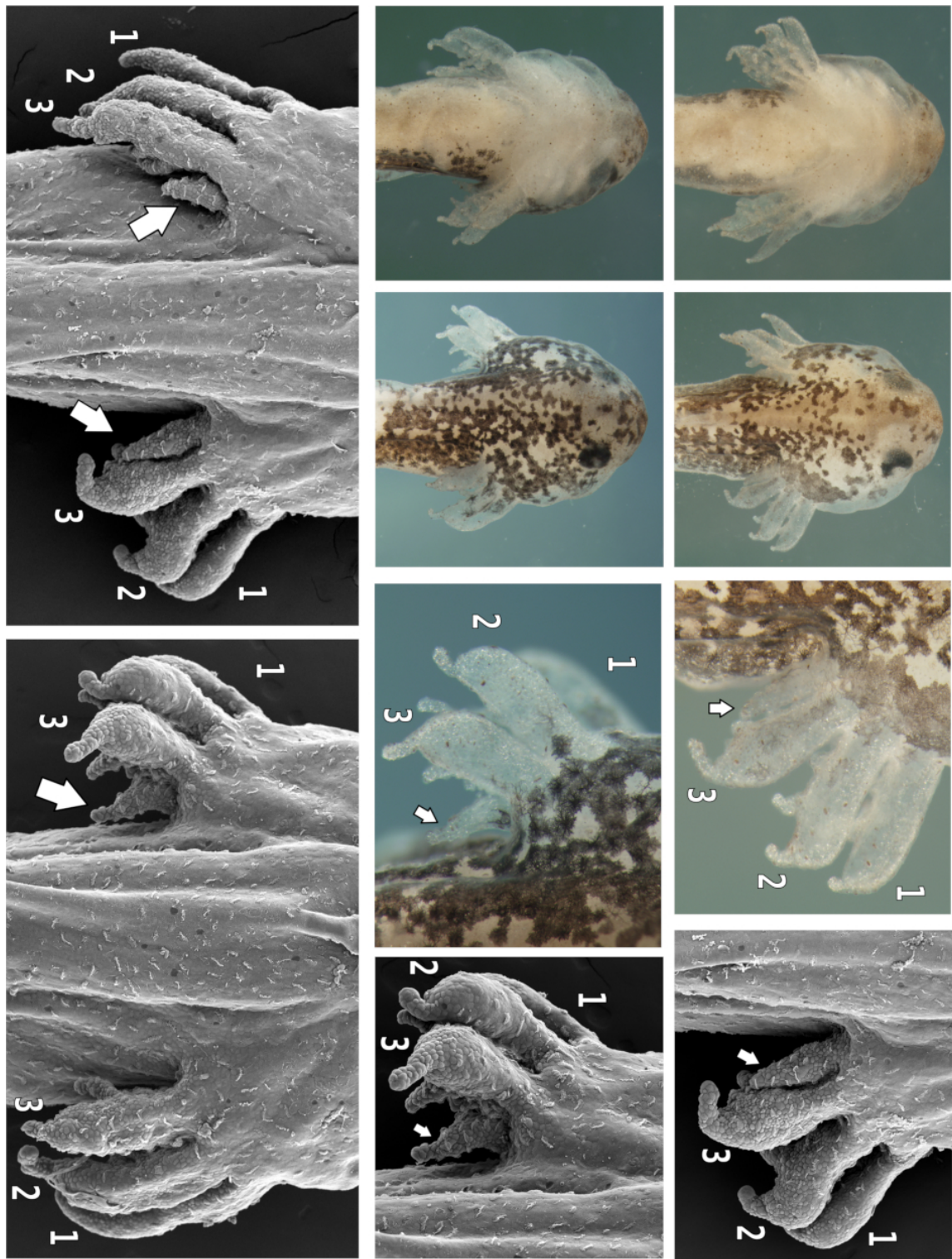
látka	koncentrace	celkem	žádné žábry		jedna žábra		dvě žábry	
			n	%	n	%	n	%
AGN193109	1,25 μ M	13	4	30,8	4	30,8	5	38,5
DMSO	0,2 %	6	6	100	0	0	0	0

D)



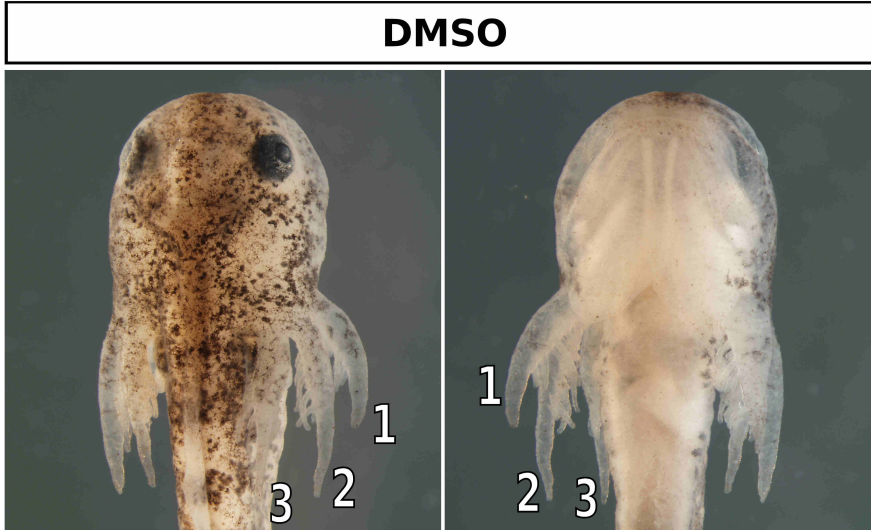
Tabule 11: Experiment 2 (1. část). Experiment s použitím inhibitoru AGN193109 v koncentraci 12,5 μM po dobu 12 dnů. A) - vnější fenotyp. Šipka ukazuje na strukturu nacházející se posteriorně od třetího branchiálního oblouku na čtvrtém branchiálním oblouku. B) - tabulka četností; žádné žábry - na čtvrtém branchiální oblouku se nevyvíjí žádná struktura, jedna žábra - unilaterální struktura, dvě žábry - bilaterální struktura. C) - graf četností.

AGN193109

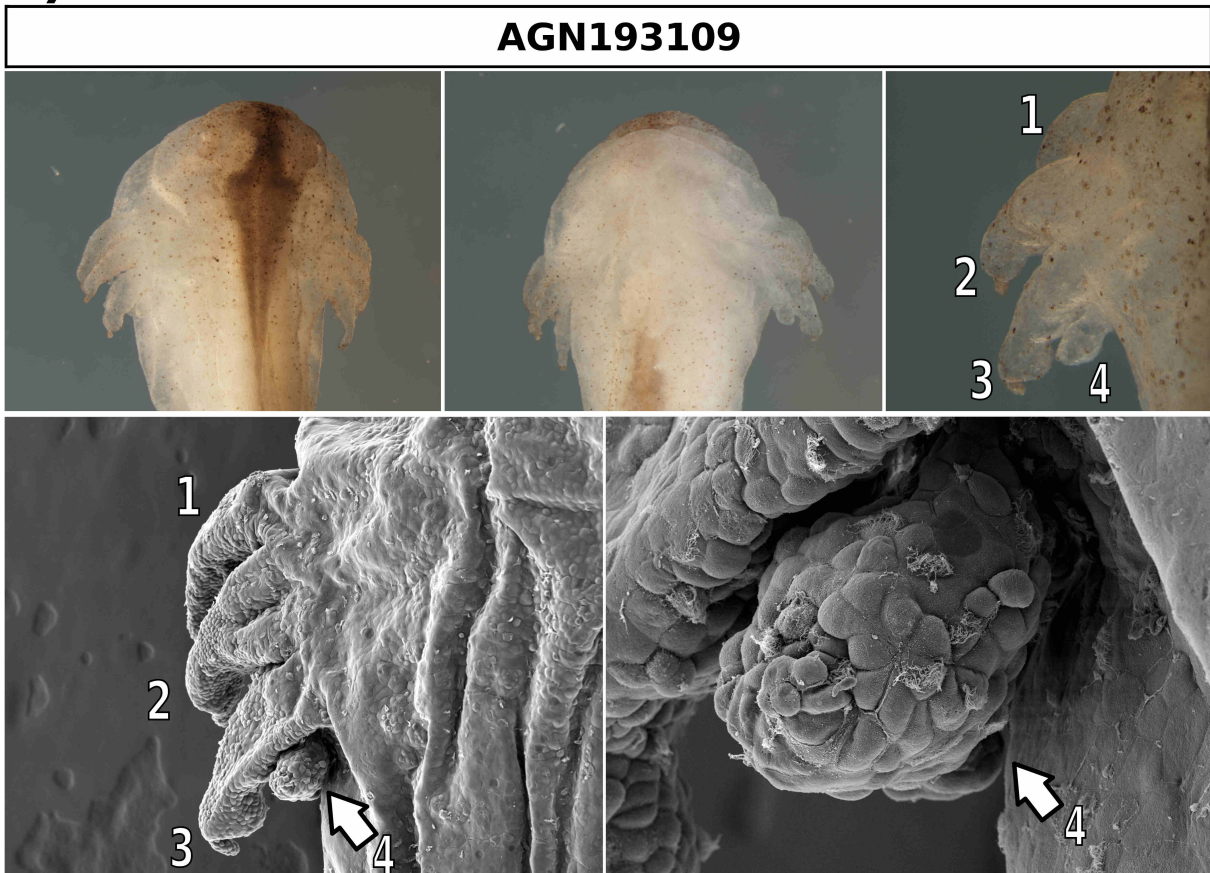


Tabule 12: Experiment 2. Experiment s použitím inhibitoru AGN193109 v koncentraci 12,5 μM po dobu 12 dnů. Pokračování Tabule 11. Fotografie ze stereomikroskopu ve srovnání se snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu. Na povrchu celého embrya včetně vnějších žaber a ektopické struktury na 4. oblouku jsou patrné buňky opatřené ciliemi. Šipka ukazuje na strukturu nacházející se posteriorně od třetího branchiálního oblouku.

A)

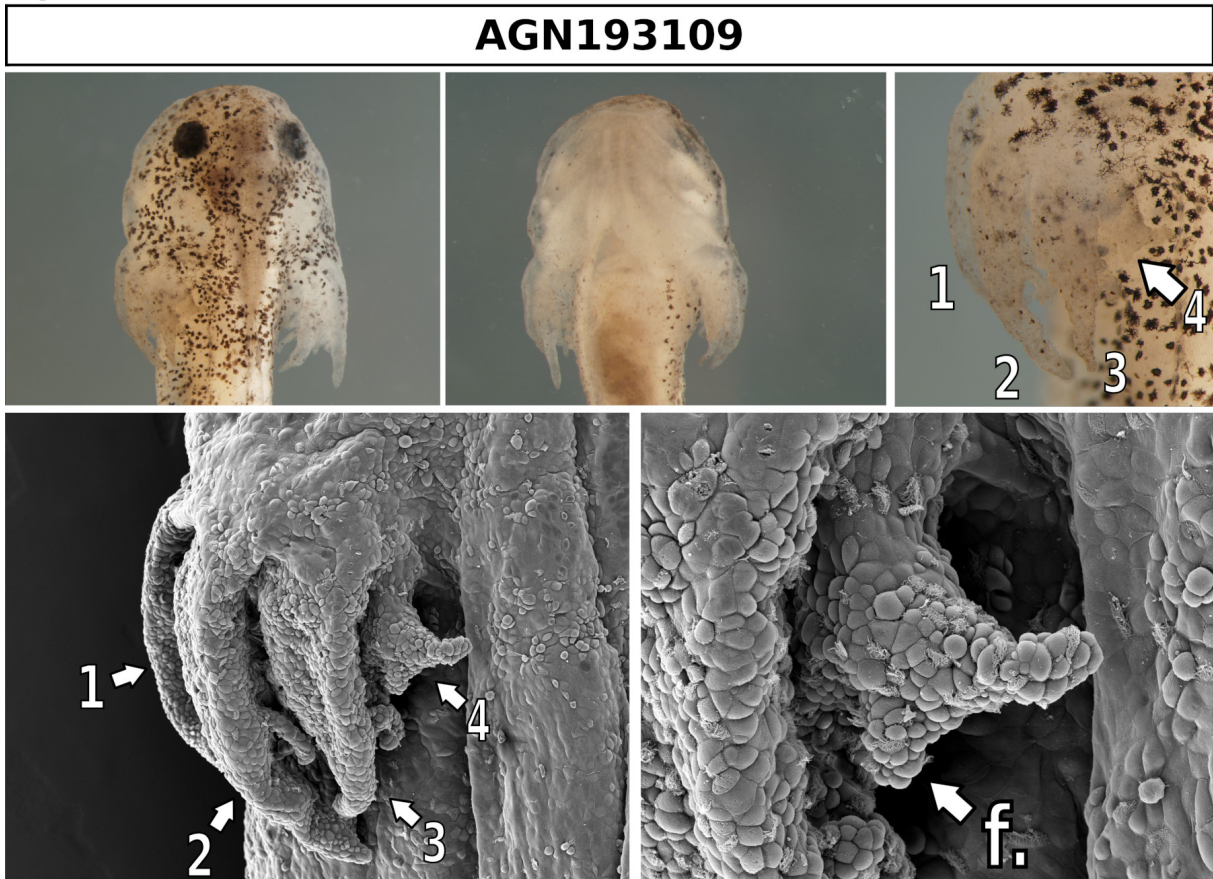


B)



Tabule 13: Experiment 3 (1. část). Experiment s AGN193109. A) - Kontrolní skupina v 0,2% DMSO. B) - Skupina vystavená inhibitoru AGN193109 (12,5 μ M). Hyobranchiální skelet zachycuje Tabule 36.

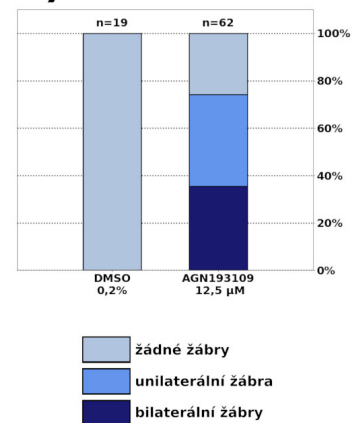
A)



B)

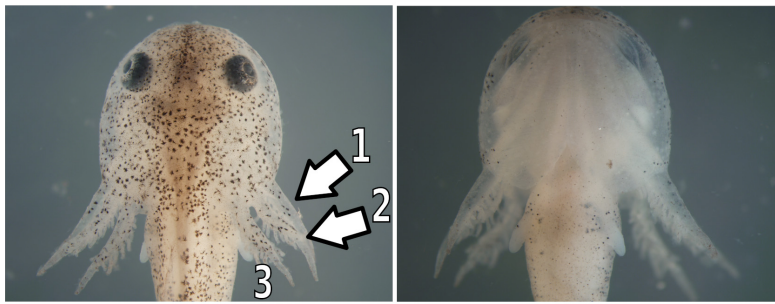
látka	konc.	celkem		žádné žábry		jedna žábra		dvě žábry	
		n	n	%	n	%	n	%	
AGN193109	1,25 μ M	62	16	25,8	24	38,7	22	35,5	
DMSO	0,2 %	19	19	100	0	0	0	0	

C)



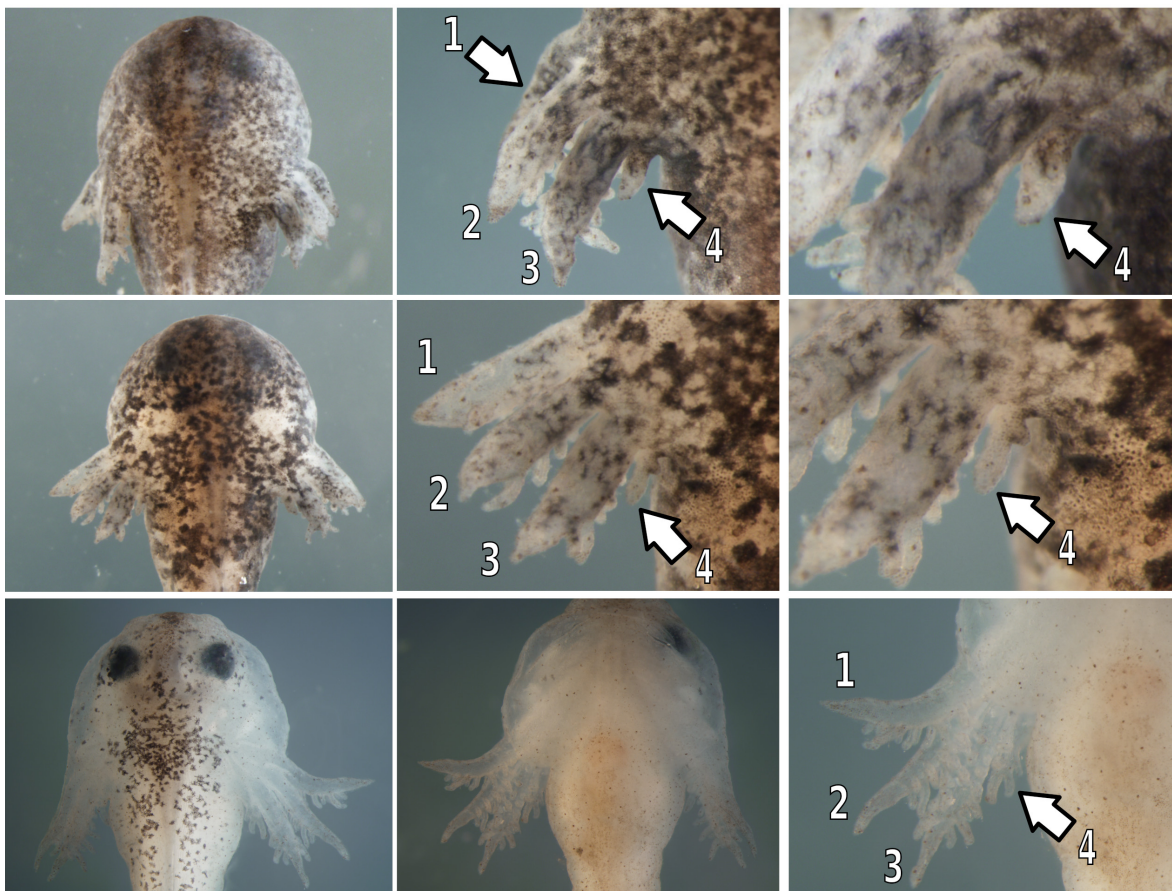
Tabule 14: Experiment 3 (2. část. A) - Vnější fenotyp larvy axolotla, která byla vystavena inhibitoru AGN193109 (12,5 μ M) po dobu 12 dní počínaje stádiem 35, B) - tabulka četností; žádné žábry - na čtvrtém branchiální oblouku se nevyvíjí žádná struktura, jedna žábra - unilaterální struktura, dvě žábry - bilaterální struktura. C) - graf četností, f.) - filament. Hyobranchiální skelet zobrazuje Tabule 36.

DMSO **A)**



B)

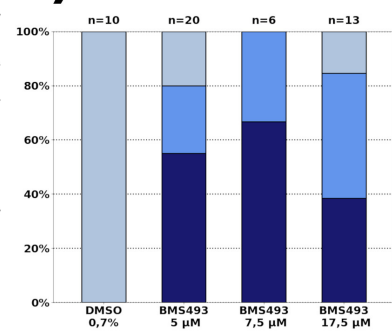
BMS493



C)

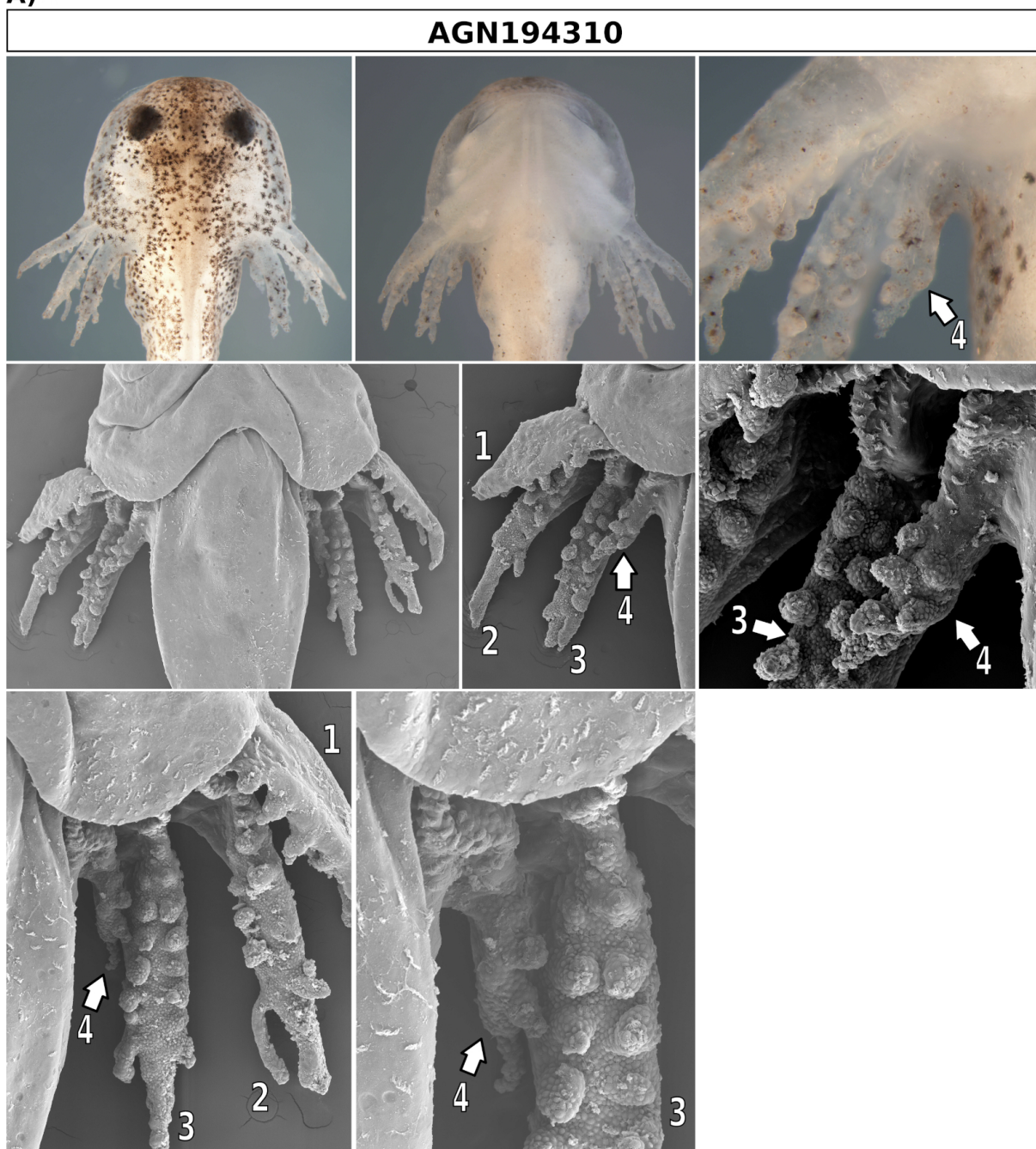
látka	konc.	celkem n	žádné žábry		jedna žábra		dvě žábry	
			n	%	n	%	n	%
BMS493	5 µM	20	4	20	5	25	11	55
BMS493	7,5 µM	6	0	0	2	33,3	4	66,6
BMS493	17,5 µM	13	2	15,4	6	46,15	5	38,46
DMSO	0,7%	6	6	100	0	0	0	0

D)



Tabule 15: Experiment 4 (1. část). První experiment s použitím inhibitorů BMS493 a AGN194310 A) - kontrolní skupina, B) - Embrya která byla vystavena inhibitoru BMS493 v koncentraci 7,5 μ M po dobu 12 dní počínaje stádiem 35, C) - tabulka; žádné žábry - na čtvrtém branchiální oblouku se nevyvíjí žádná struktura, jedna žábra - unilaterální struktura, dvě žábry - bilaterální struktura. D) - graf. Hyobranchiálních skelet embryí z této skupiny je zachycen na tabulích 37 a 38.

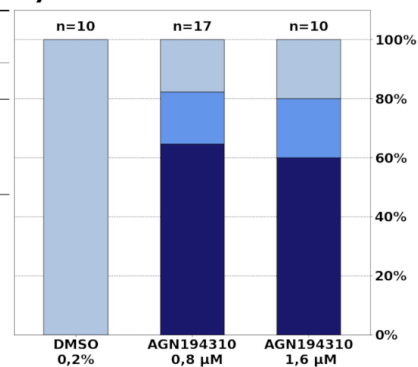
A)



C)

látka	konc.	celkem	žádné žábry		jedna žábra		dvě žábry	
			n	%	n	%	n	%
AGN194310	1,6 μ M	17	3	17,65	3	17,65	11	64,7
AGN194310	0,8 μ M	10	2	20	2	20	6	60
DMSO	0,2%	14	14	100	0	0	0	0

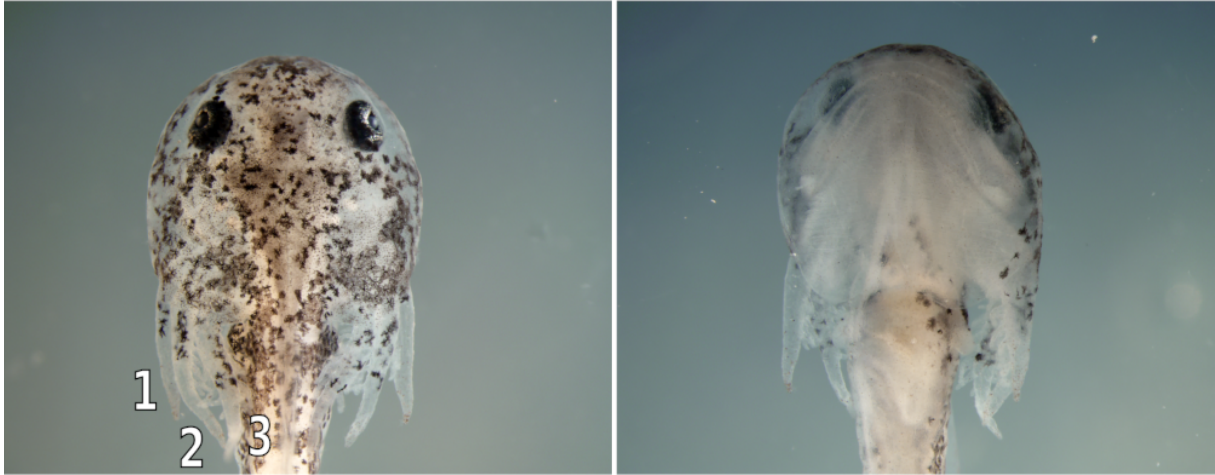
B)



Tabule 16: Experiment 4 (2. část). A) - Embryo axolotla vystavené inhibitoru AGN194310 (0,8 μM) po dobu 12 dní počínaje stádiem 35. Snímky stejného jedince ze stereomikroskopu a skenovacího elektronového mikroskopu. B) - graf četností fenotypů. C) - tabulka četností fenotypů; žádné žábry - na čtvrtém branchiální oblouku se nevyvíjí žádná struktura, jedna žábra - unilaterální struktura, dvě žábry - bilaterální struktura. Hyobranchiální skelet zobrazuje Tabule 39.

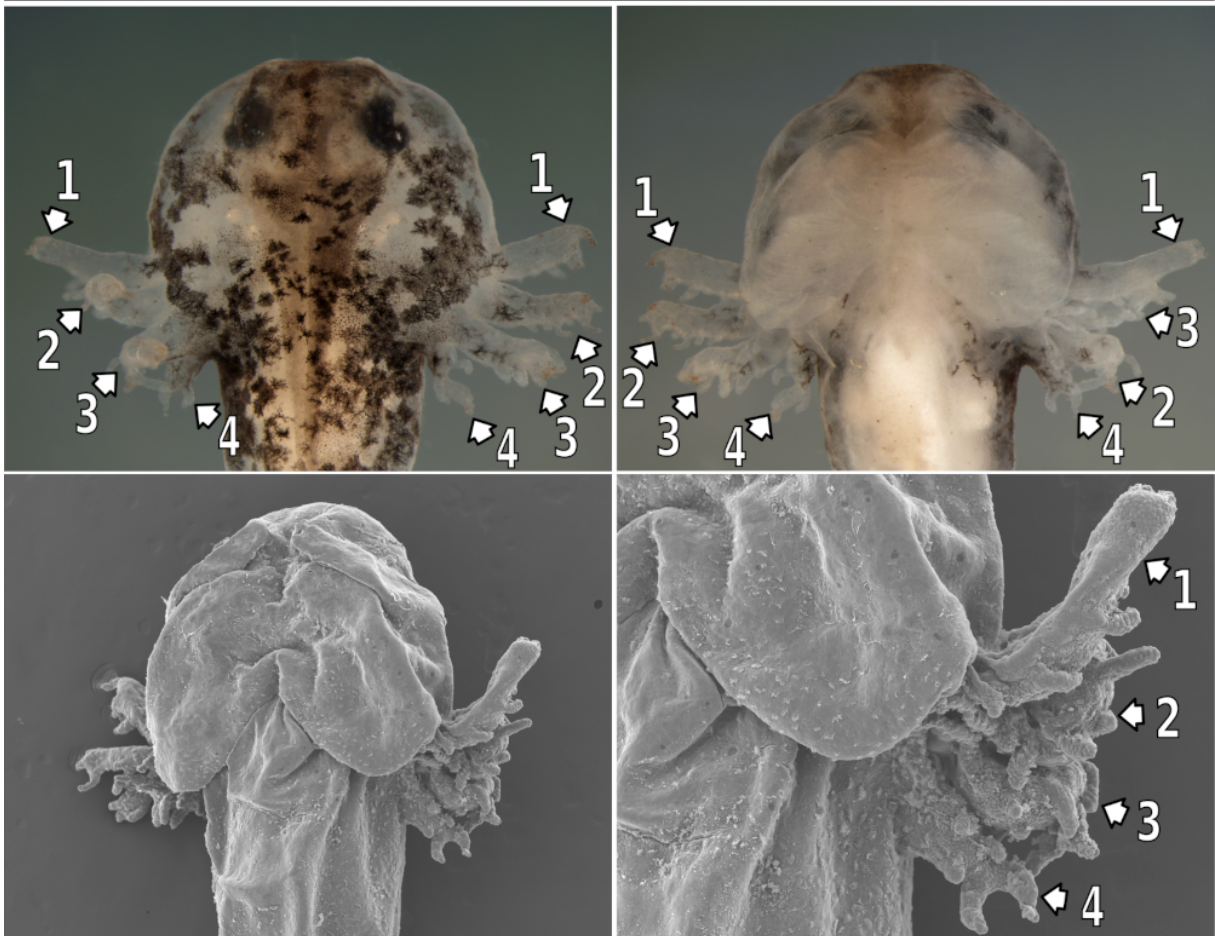
A)

DMSO



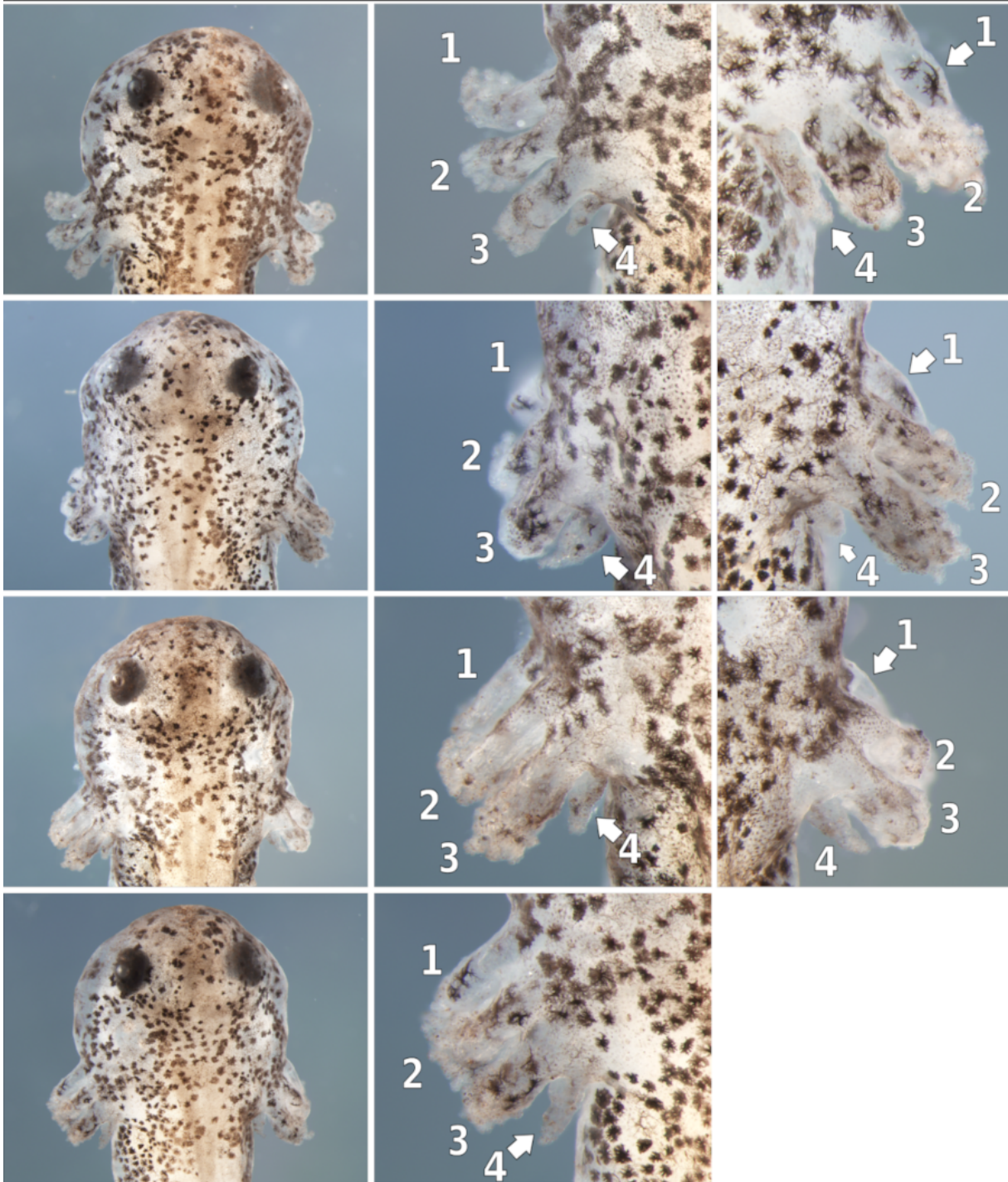
B)

BMS493



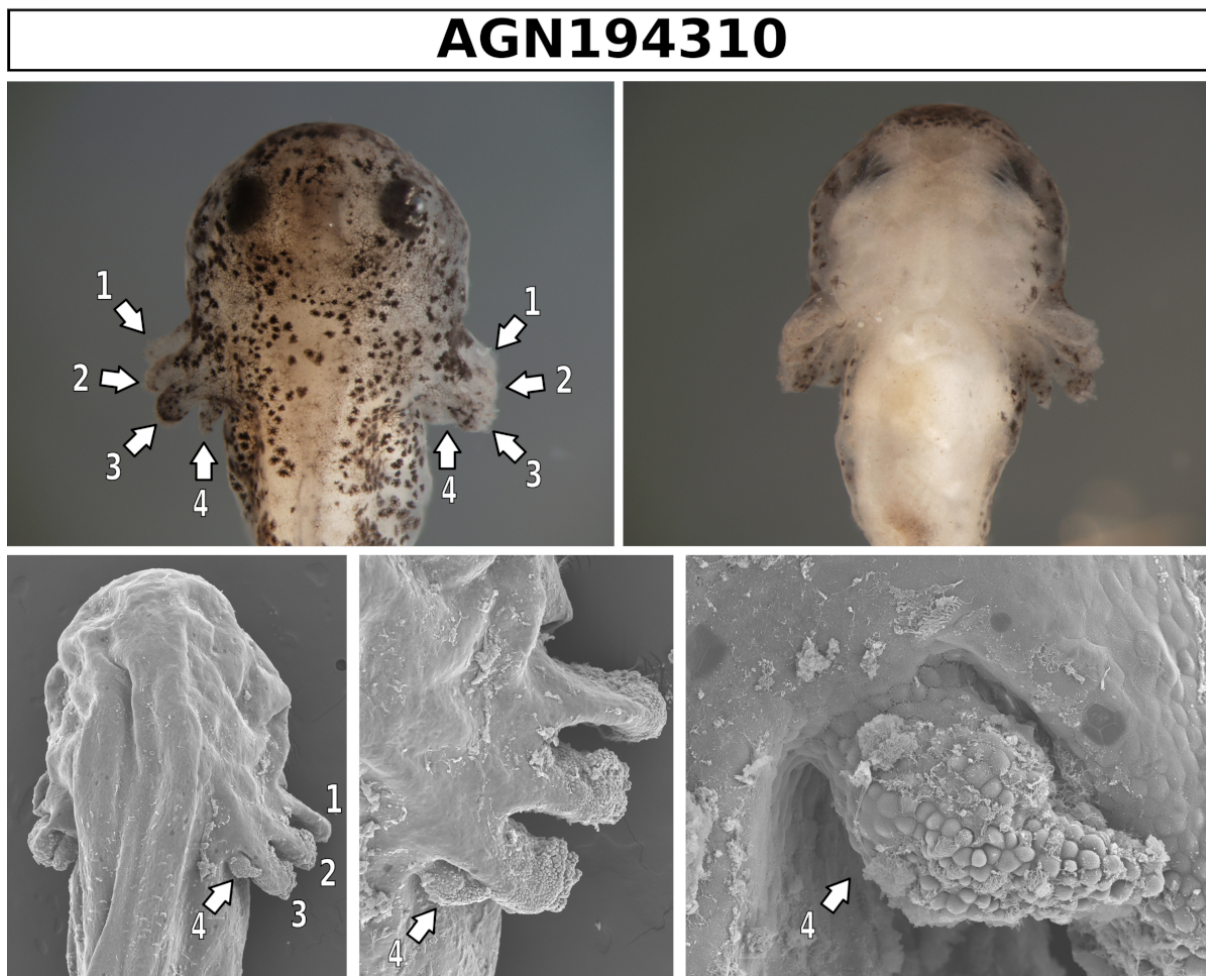
Tabule 17: Experiment 5. A) - vnější fenotyp larev axolotla, která byla vystavena 0,2% DMSO. B) - vnější fenotyp larev axolotla, která byla vystavena inhibitoru BMS493 7,5 μ M . Experiment trval 12 dní od stádia 35.

AGN194310



Tabule 18: Experiment s AGN194310 a BMS493 (2. část). Celkové fenotypy embryí vystavených inhibitoru receptorů RAR po dobu 12 dnů počínaje stádiem 35. U všech embryí je přítomna alespoň jedna žábra 4. páru. 1 - první pár vnějších žaber, 2 - druhý pár vnějších žaber, 3 - třetí pár vnějších žaber, 4 - čtvrtý pár vnějších žaber. Všechny žábry jsou výrazně zkrácené a vykazují značný defekt. Hyobranchiální skelet zobrazuje Tabule 35.

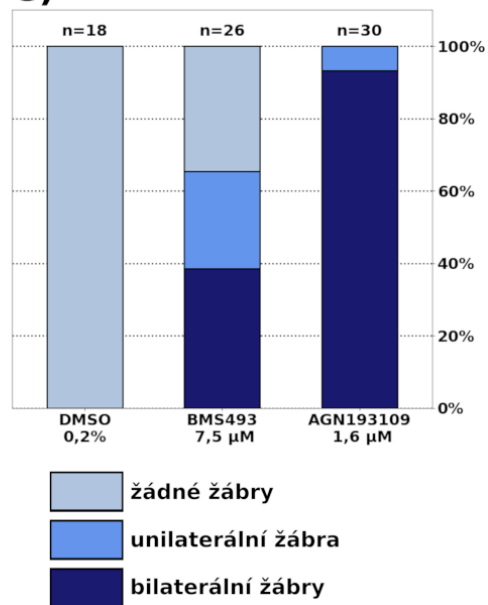
A)



B)

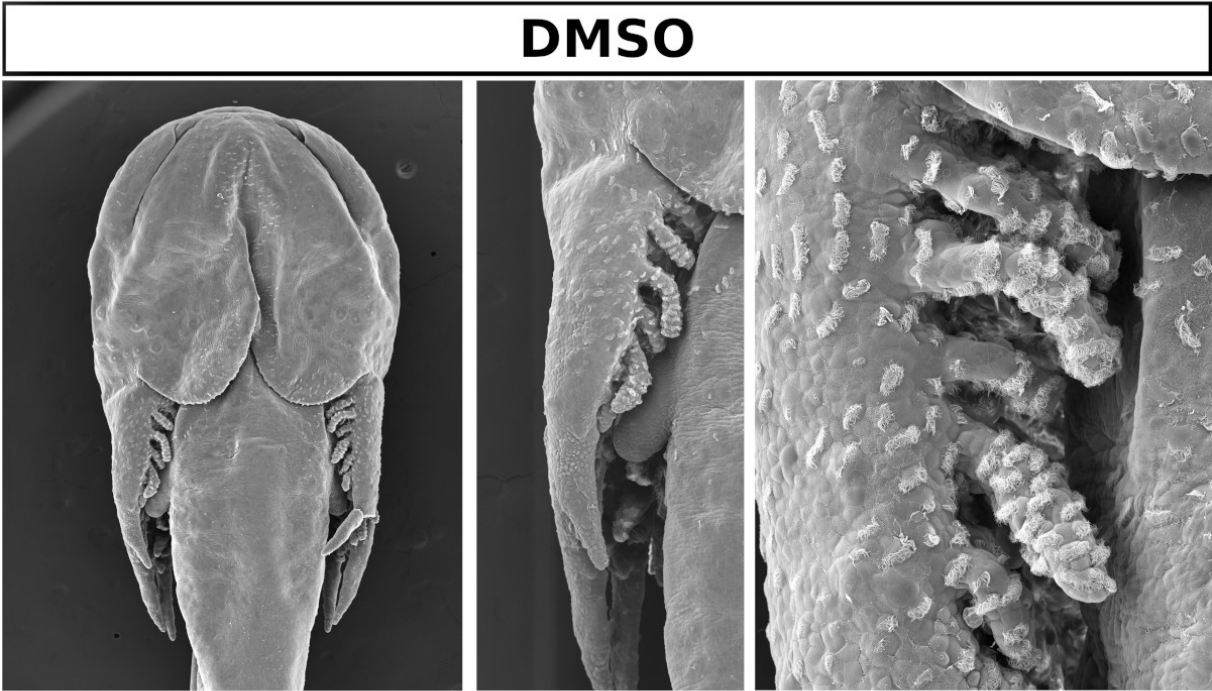
látka	konc.	celkem		žádné žábry		jedna žábra		dvě žábry	
		n	%	n	%	n	%	n	%
AGN194310	1,6 μ M	30		0	0	2	6,7	28	93,3
BMS493	7,5 μ M	26		9	34,6	7	26,9	10	38,5
DMSO	0,2 %	18		18	100	0	0	0	0

C)

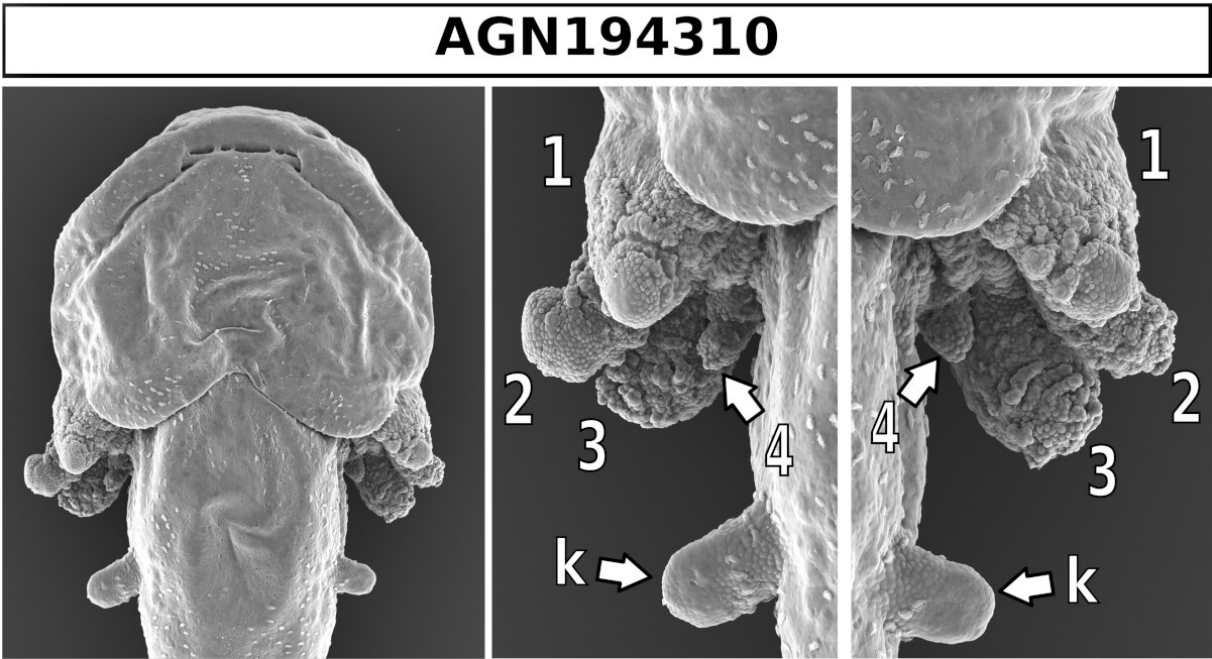


Tabule 19: Experiment 5 (3. část). A) - fenotypy embryí axolotla po 12 dnech v roztoku inhibitoru AGN194310 v koncentraci 1,6 μM . B) - tabulka četností fenotypů v experimentálních skupinách vystavených BMS493; žádné žábry - na čtvrtém branchiální oblouku se nevyvíjí žádná struktura, jedna žábra - unilaterální struktura, dvě žábry - bilaterální struktura. C) - graf četností. 1 - první pár vnějších žaber, 2 - druhý pár vnějších žaber, 3 - třetí pár vnějších žaber, 4 - čtvrtý pár vnějších žaber. Všechny žábry jsou výrazně zkrácené a vykazují značný defekt.

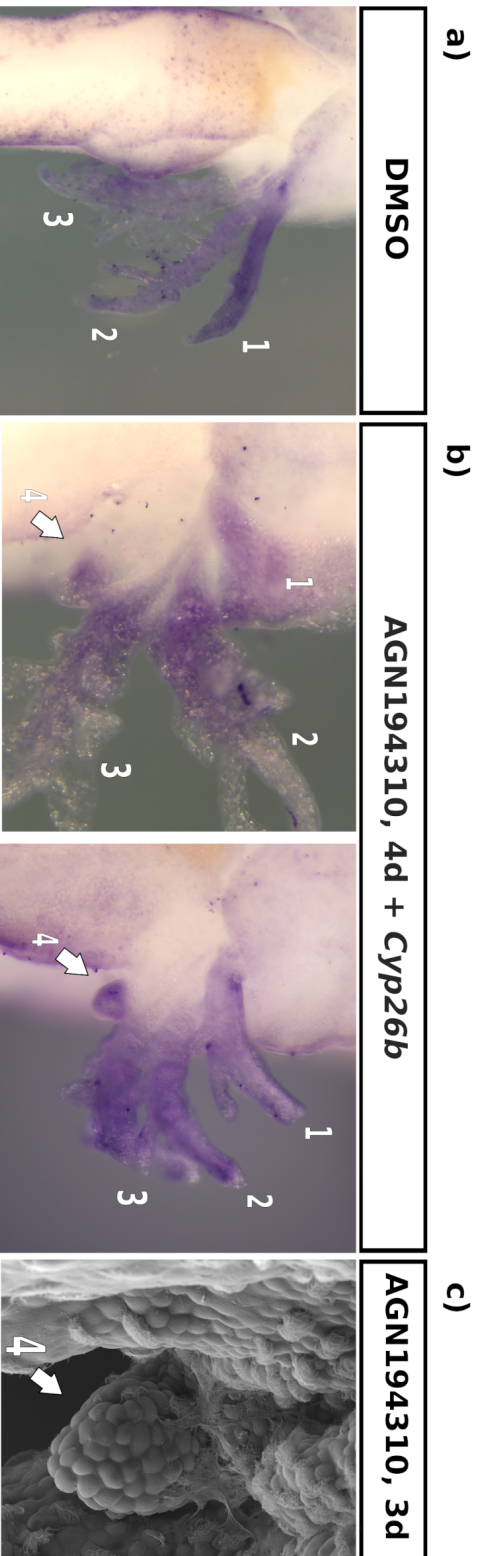
A)



B)

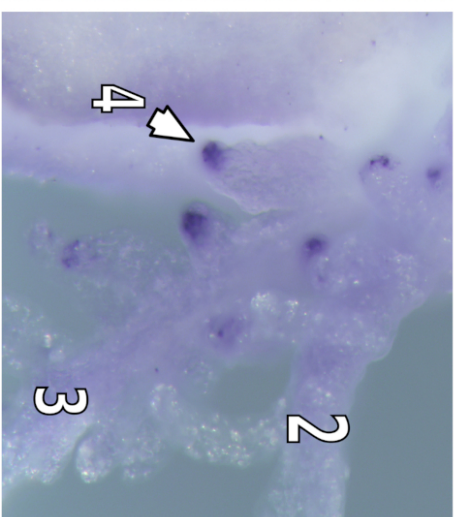
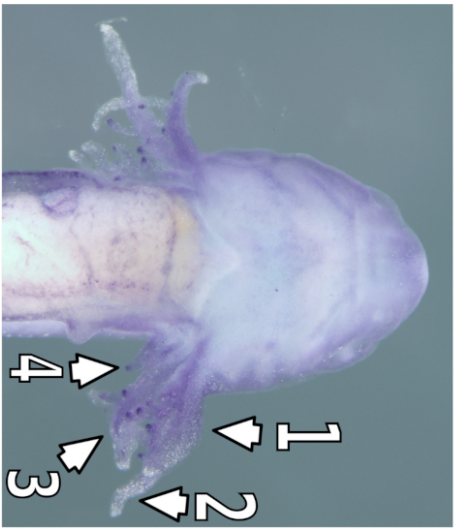
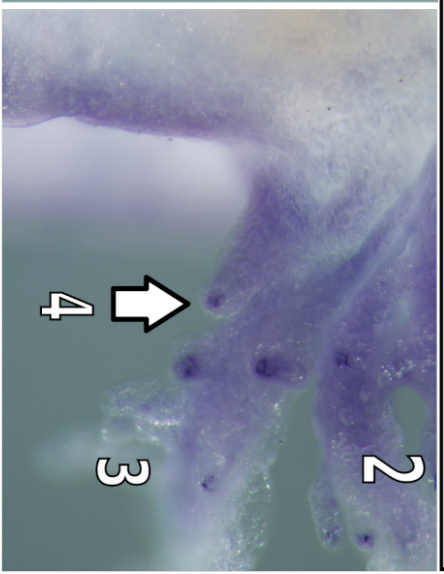
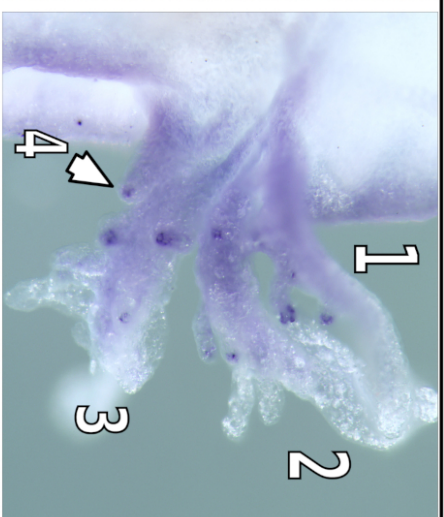
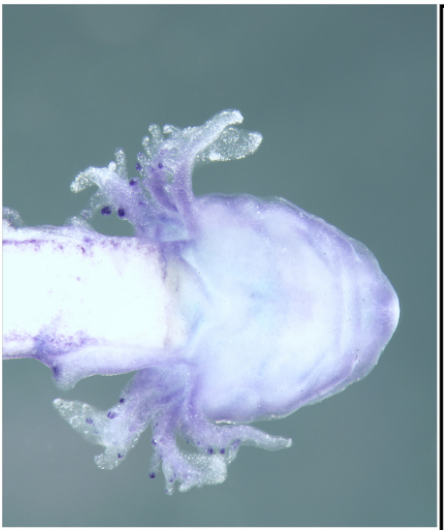


Tabule 20: Experiment 6 (SEM). A) - kontrolní skupina v 0,2% DMSO. B) - celkový fenotyp embrya axolotla vystaveného inhibitoru AGN194310 v koncentraci 1,6 μM . 1 - první pár žaber, 2 - pár žaber, 3 - pár žáber, 4 - pár žaber, k - základ končetiny.



Tabule 21: Experiment 7, korelace *Cyp26b* a SEM. a) - kontrola, b) - Embrya vystavená inhibitoru AGN194310 po dobu 4 dnů. c) - snímek indukovaného základu vnější žábry ze skenovacího mikroskopu. 1 - první pár žaber, 2 - druhý pár žaber, 3 - třetí pár žaber, 4 - základ čtvrtého páru žaber. V základu vnější žábry v tomto stupni vývoje probíhá endogenní inhibice signalizace kyseliny retinové podobně jako v normálně se vyvíjejících žábřích (Tabule 9, 6, 7 a 8).

Raldh2 + AGN194310

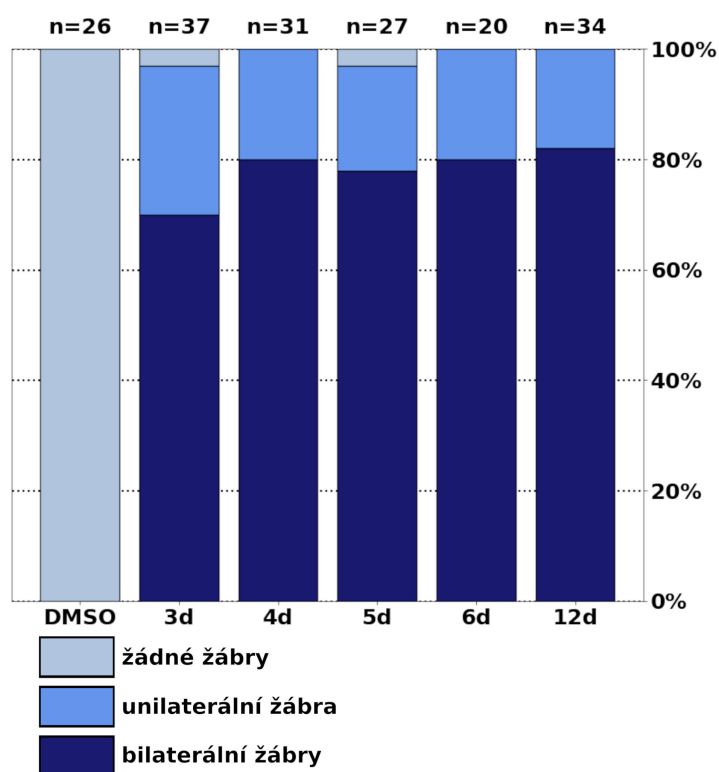


Tabule 22: Experiment 6. Expresse *Raldh2* v indukovaných žábrách. 1 - První pár žaber, 2 - Druhý pár žaber, 3 - Třetí pár žaber, 4 - Základ čtvrtého páru žaber. Indukovaná žábra na čtvrtém branchiálním oblouku exprimuje *Raldh2* v růstové špičce stejně jako normální žábry (Tabule 4).

A)



B)

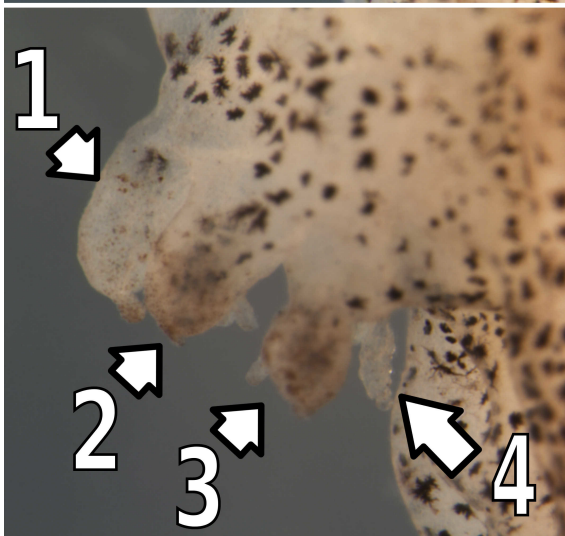


C)

látka	konc.	čas	celkem	žádné žábry		jedna žábra		dvě žábry	
				n	%	n	%	n	%
AGN194310	1,6 μ M	12 dní	34	0	0	6	18	28	82
AGN194310	1,6 μ M	6 dní	20	0	0	4	20	16	80
AGN194310	1,6 μ M	5 dní	27	1	3	5	19	21	78
AGN194310	1,6 μ M	4 dní	31	0	0	6	20	25	80
AGN194310	1,6 μ M	3 dní	37	1	2	10	27	26	70
DMSO	0,2 %	12 dní	26	26	100	0	0	0	0

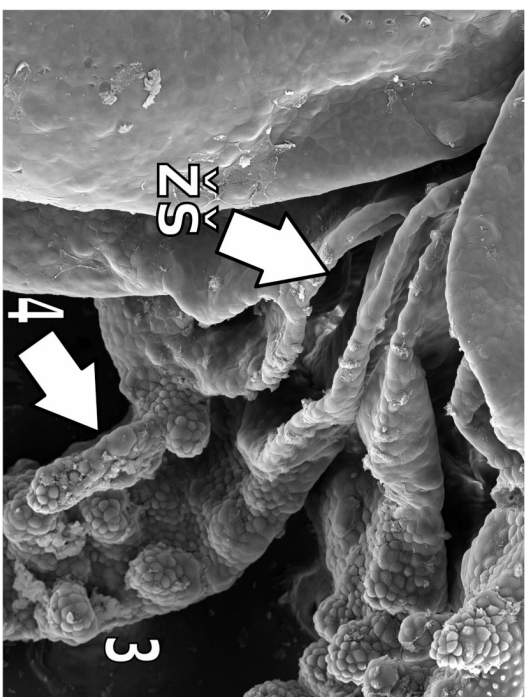
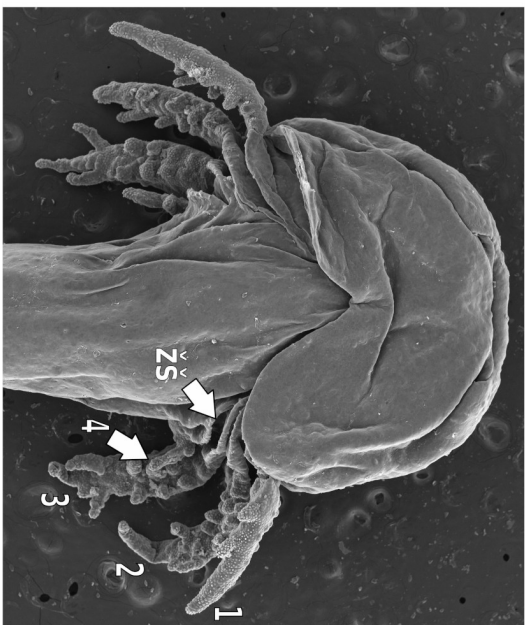
Tabule 23: Experiment 8, kontrola, 3 dny, graf. A) - celkový fenotyp embrya kontrolní skupiny vystaveného DMSO v koncentraci 0,2% po dobu 12 dní. Snímek ze stereomikroskopu. 1 - žábra prvního páru, 2 - žábra druhého páru, 3 - žábra třetího páru. B) - graf četností jednotlivých fenotypů; DMSO - kontrolní skupina, 3d - 3 dny, 4d - 4 dny, 5d - 5 dnů, 6d - 6 dnů, 12d - 12 dnů. C) - tabulka četností jednotlivých fenotypů; žádné žábry - na čtvrtém branchiální oblouku se nevyvíjí žádná struktura, jedna žábra - unilaterální struktura, dvě žábry - bilaterální struktura.

AGN194310, 12d



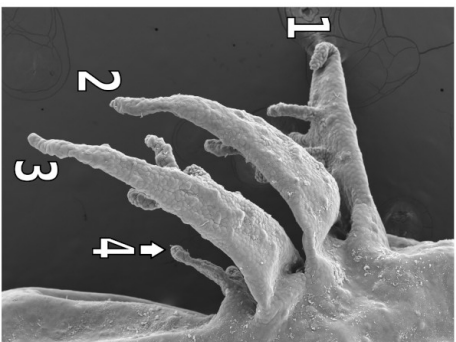
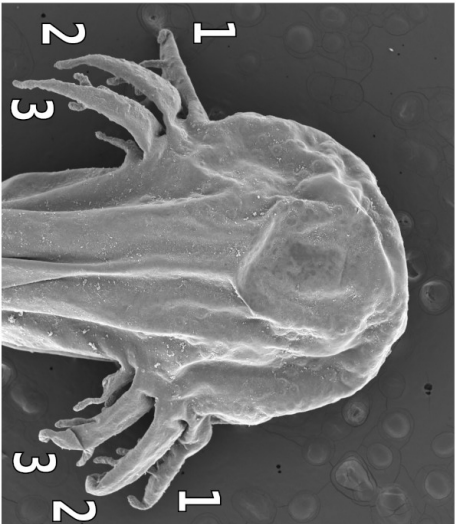
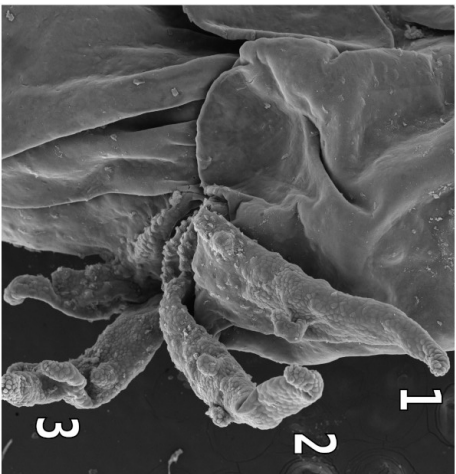
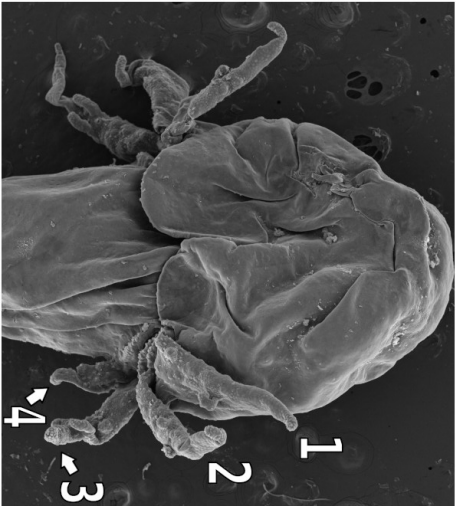
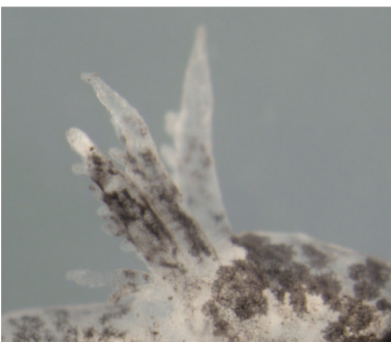
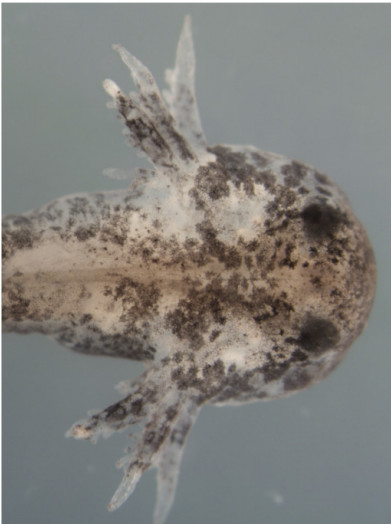
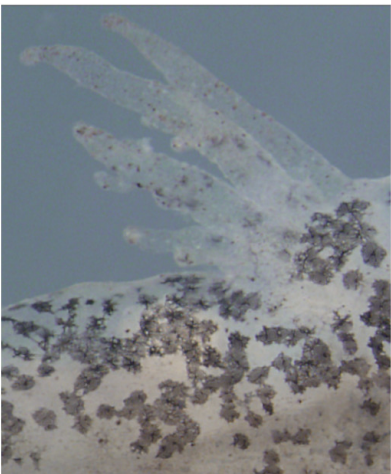
Tabule 24: Experiment 8, 12 dnů. Celkový fenotyp embrya axolotla vystaveného inhibitoru AGN194310 v koncentraci 1,6 μM po dobu 12 dní. Snímky ze stereomikroskopu. 1 - žábra prvního páru, 2 - žábra druhého páru, 3 - žábra třetího páru. Defekt všech vnějších žaber je patrný podobně jako na tabulích 17 a 18.

AGN194310, 12d



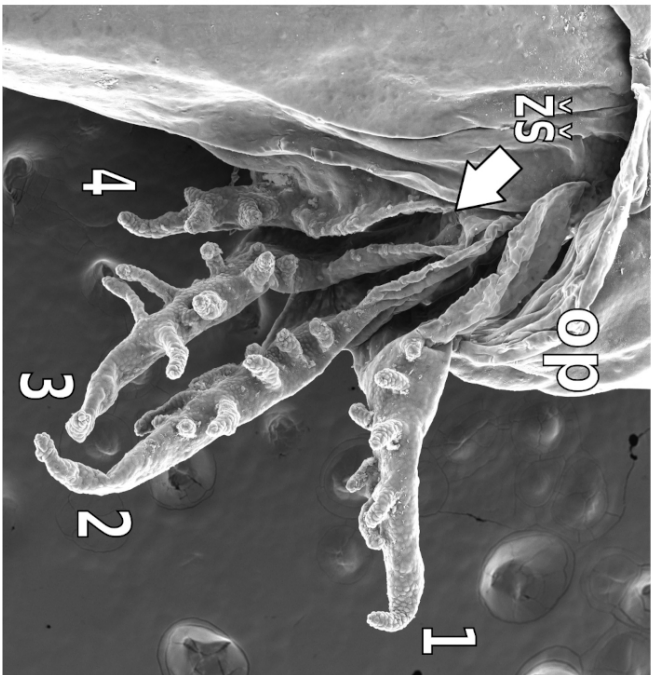
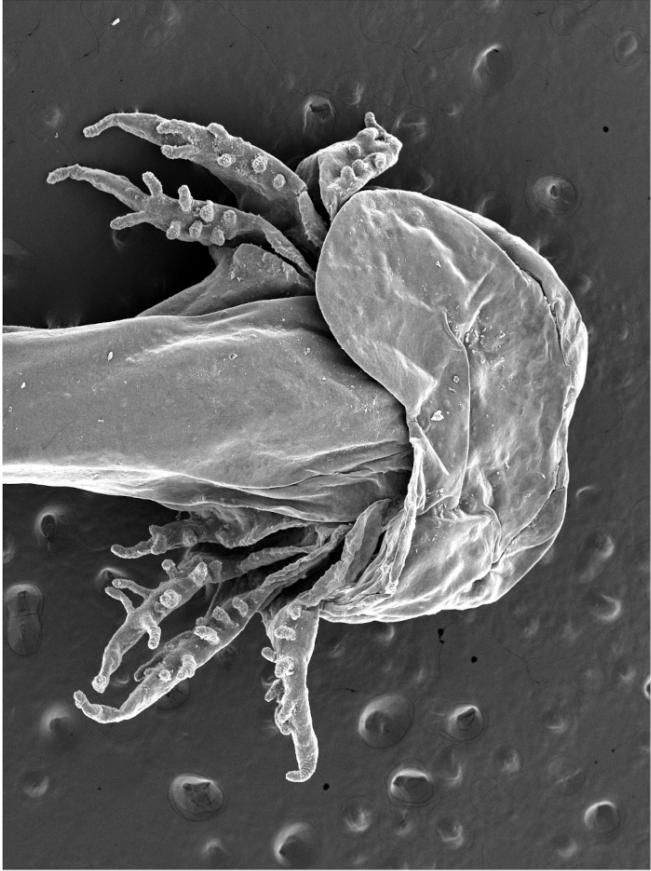
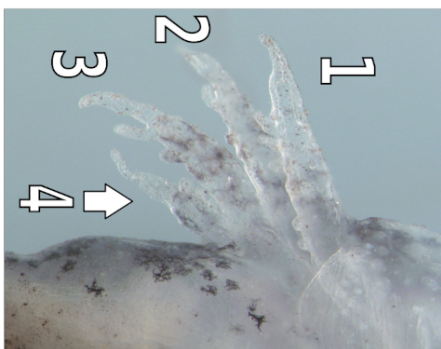
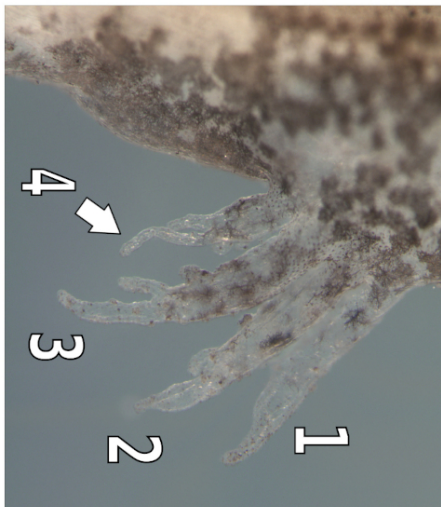
Tabule 25: Experiment 8, 12 dnů (SEM). Celkový fenotyp embrya axolotla vystaveného inhibitoru AGN194310 v koncentraci 1,6 μM po dobu 12 dní. Srovnání snímků ze stereomikroskopu se snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu.

AGN194310, 4d



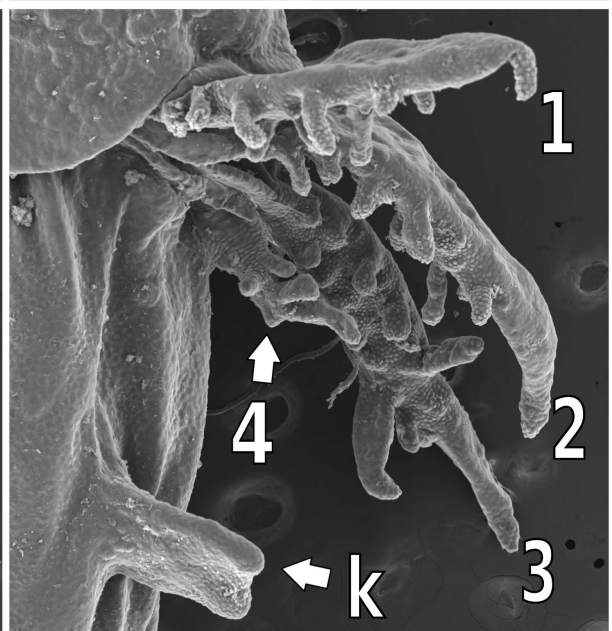
Tabule 26: Experiment 8, 4 dny (SEM). Celkový fenotyp embrya axolotla vystaveného inhibitoru AGN194310 v koncentraci 1,6 μM po dobu 4 dnů z 12. Fotografie ze stereomikroskopu ve srovnání se snímky stejných jedinců ze skenovacího elektronového mikroskopu. 1 - první pár žaber, 2 - druhý pár žaber, 3 - třetí pár žaber, 4 - čtvrtý pár žaber.

AGN194310, 4d



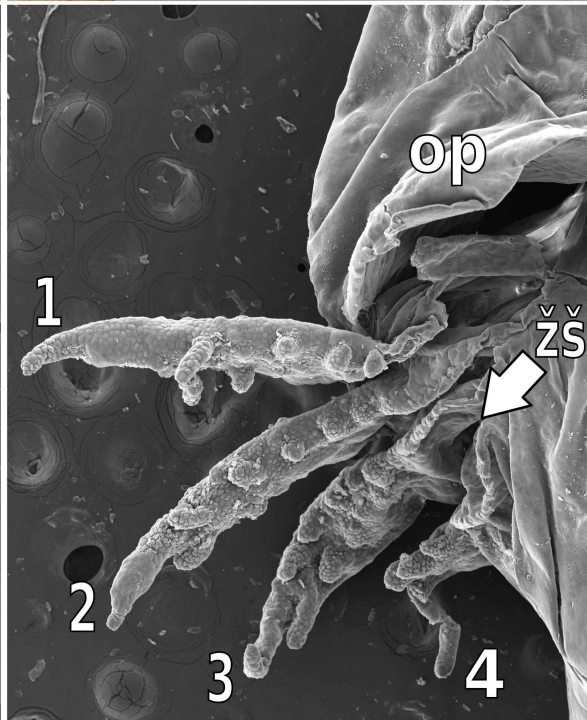
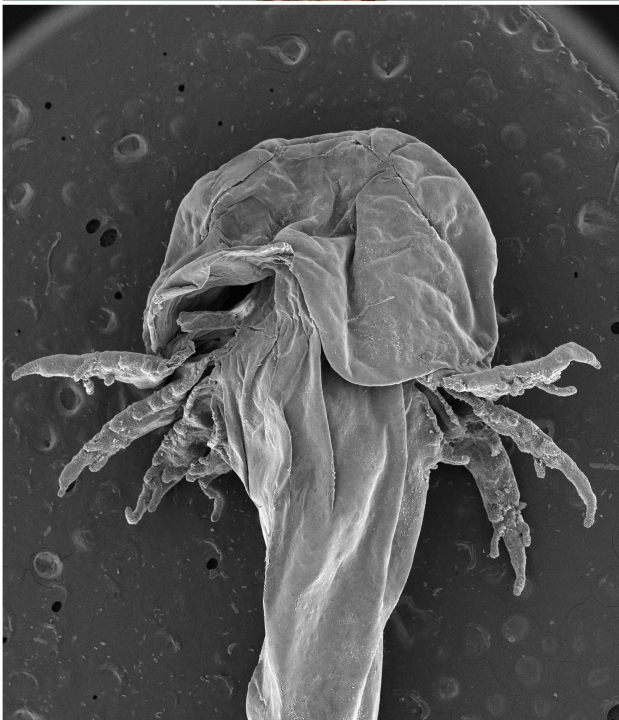
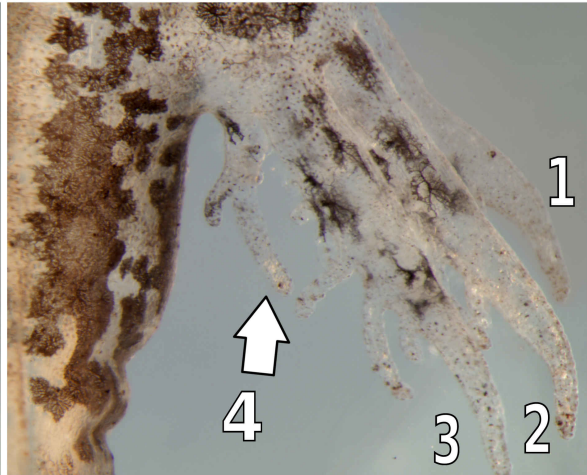
Tabule 27: Celkový fenotyp embrya axolotla vystaveného inhibitoru AGN194310 v koncentraci 1,6 μM po dobu 4 dnů z 12. Nahoře: snímky ze stereomikroskopu. Dole: snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu. žš - žaberní štěrbin, 1 - první pár žaber, 2 - druhý pár žaber, 3 - třetí pár žaber, 4 - čtvrtý pár žaber. Všechny snímky zachycují stejného jedince.

AGN194310, 3d

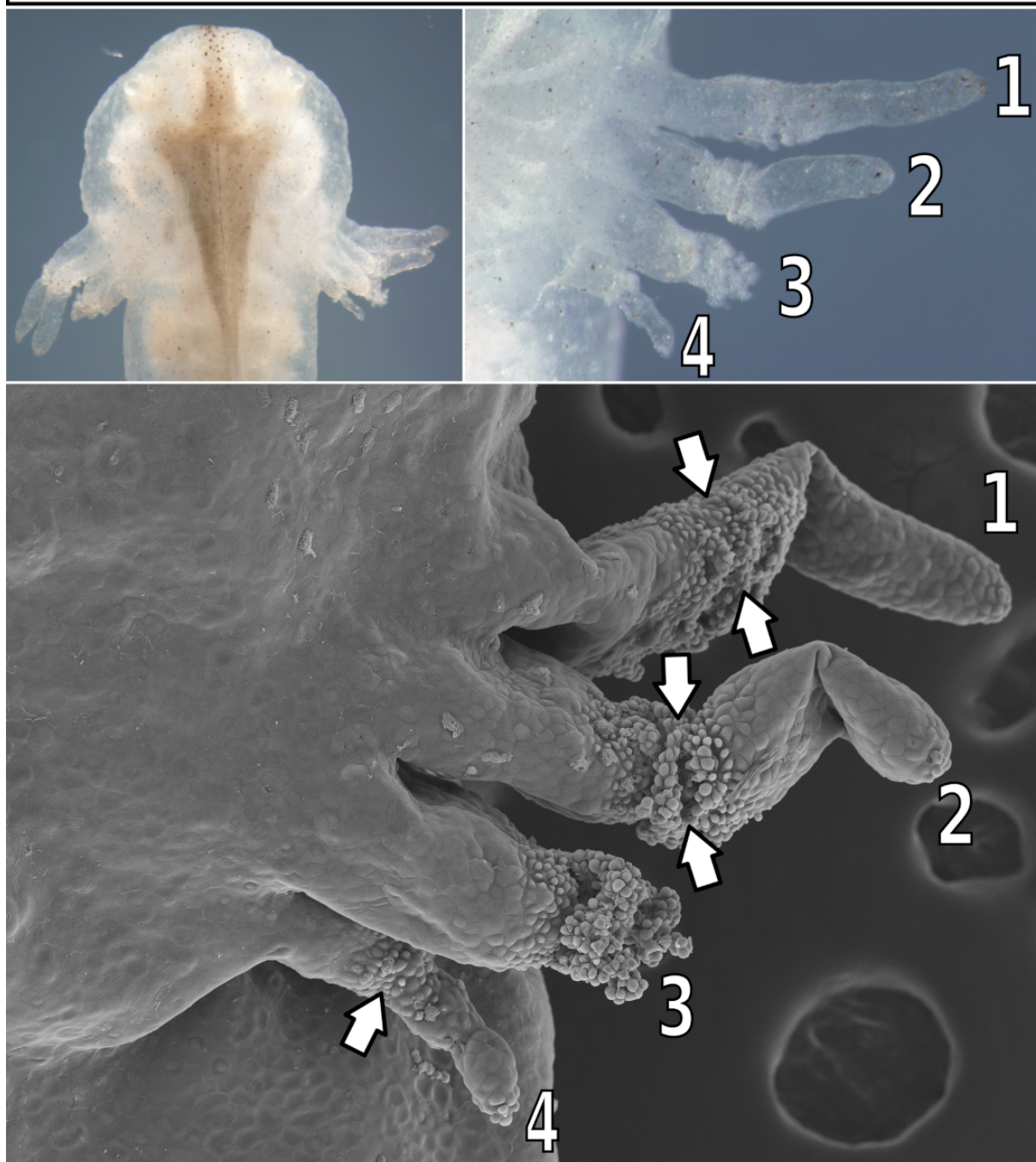


Tabule 28: Experiment s AGN94310, 3 dny (SEM). Celkový fenotyp embrya axolotla vystaveného inhibitoru AGN194310 v koncentraci 1,6 μM po dobu 3 dnů z 12. k - základ končetiny, op - operkulum, 1 - první pár žaber, 2 - druhý pár žaber, 3 - třetí pár žaber, 4 - čtvrtý pár žaber. Na levé straně je operkulum zvednuté. Hyobranchiální skelet embryí ze stejné experimentální skupiny zobrazje Tabule 31. Podobnou předčasnou končetinu barvenou alciánovou modří ukazuje Tabule 33, B.

AGN194310, 3d



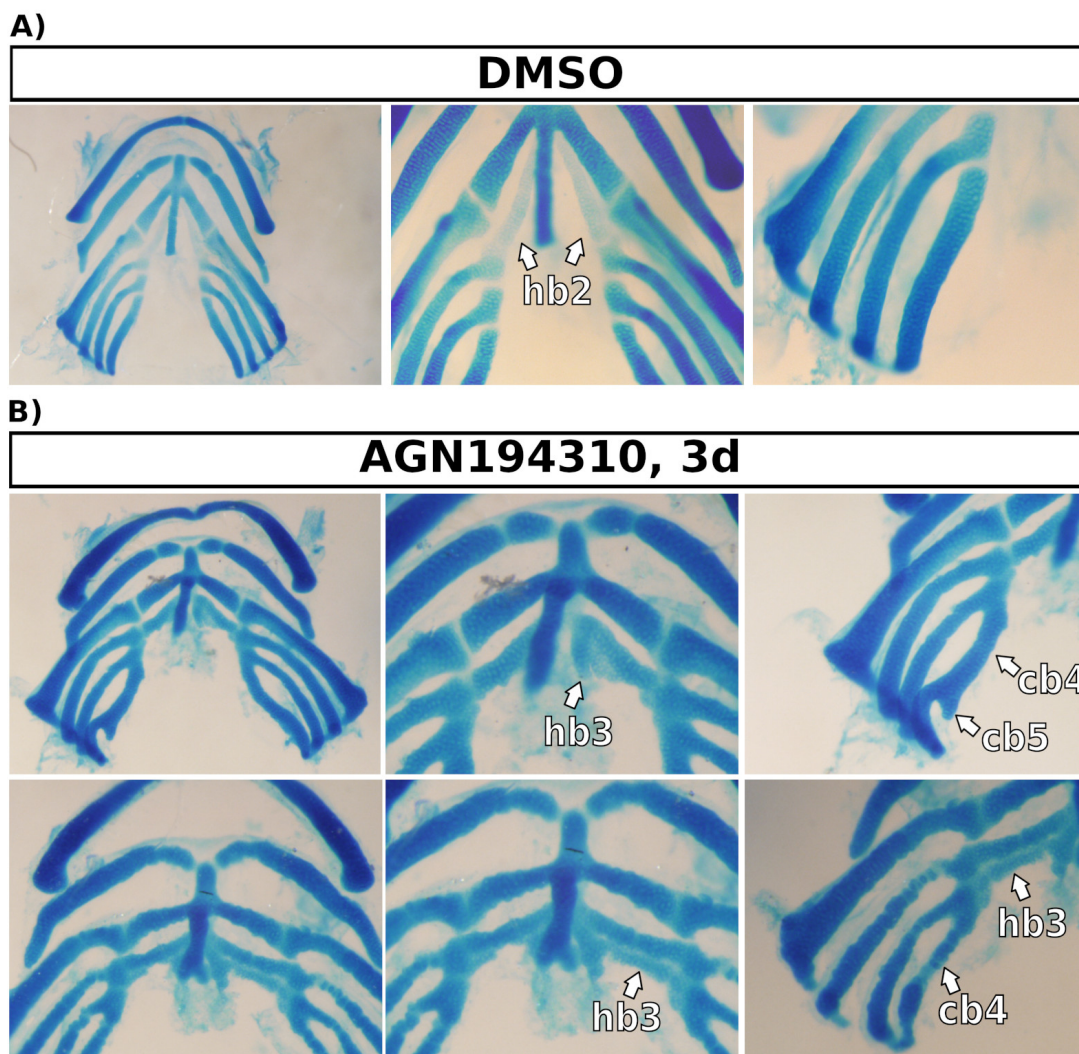
Tabule 29: Experiment s 8. Celkový fenotyp embrya axolotla vystaveného inhibitoru AGN194310 v koncentraci 1,6 μM po dobu 3 dnů z 12. žš - žaberní štěrbin, op - operkulum, 1 - první pár žaber, 2 - druhý pár žaber, 3 - třetí pár žaber, 4 - čtvrtý pár žaber. Hyobranchiální skelet je na tabuli 31.

A)**AGN194310, 4d****B)**

látka	konc.	čas	celkem	obnovení		bez obnovení	
			n	n	%	n	%
AGN194310	1,8 μ M	4 dny	18	10	55,6	8	44,4
AGN194310	1,8 μ M	12 dnů	9	1	11,1	8	88,9
DMSO	0,2 %	21	9	0	0	0	0

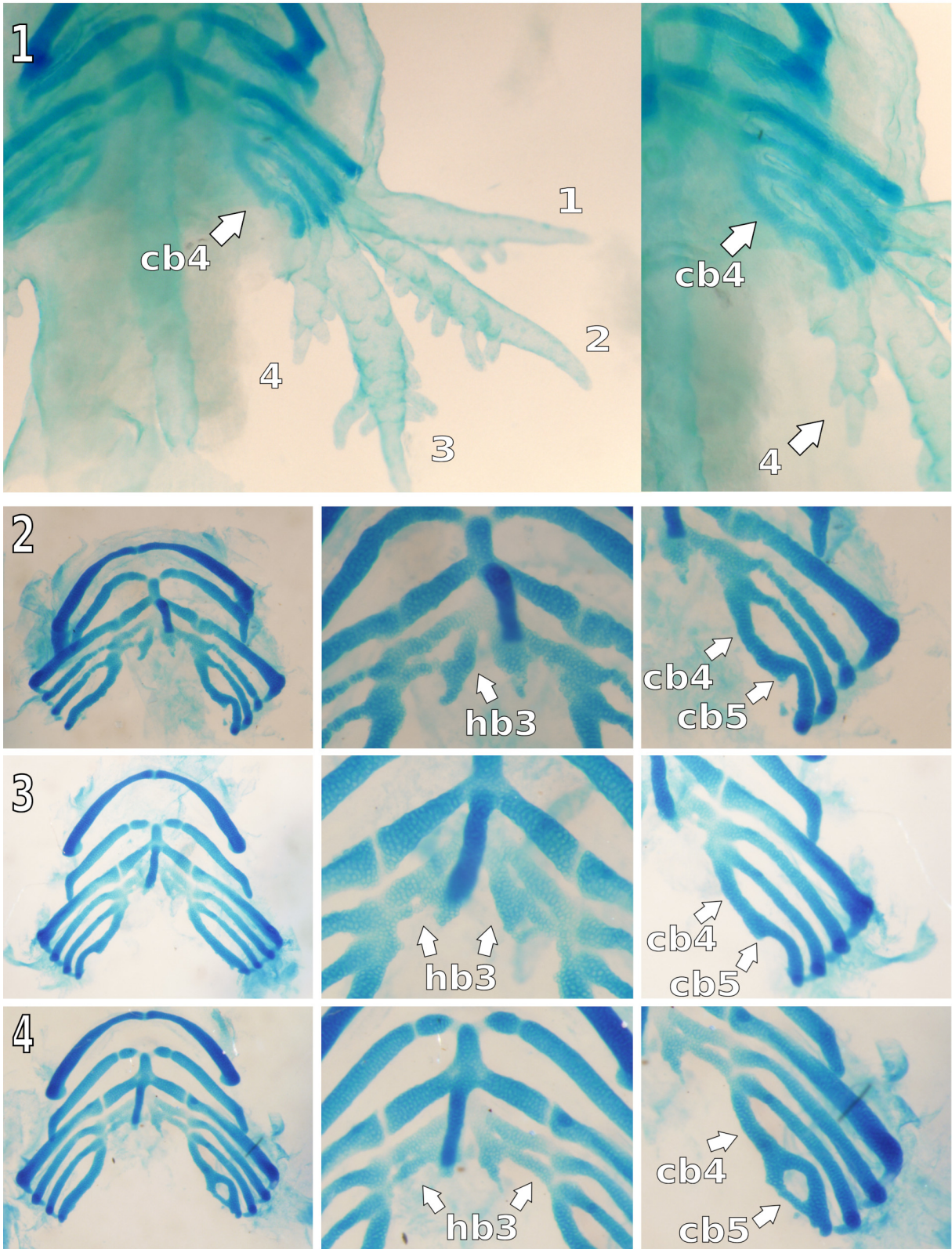
Tabule 30: Experiment 9. A) -cCelkový fenotyp embrya axolotla vystaveného inhibitoru AGN194310 v koncentraci 1,8 μ M po dobu 3 dnů z 12. žš - žaberní štěrbin, op - operkulum, 1 - první pár žaber, 2 - druhý pár žaber, 3 - třetí pár žaber, 4 - čtvrtý pár žaber. První, druhý a čtvrtý pár žaber vykazují obnovené vyrůstání orgánu po silné inhibici signalizace kyseliny retinové. Šipky ukazují předěl mezi oběma fázemi. U žábry třetího páru (3) nedošlo k obnovení vyrůstání orgánu. B) - tabulka četností fenotypů. obnovení - růst žábry se obnovil po odstranění inhibitoru, bez obnovení - po odstranění inhibitoru nedošlo k obnovení růstu orgánu. v kontrolní skupině nedošlo ani k zastavení orgánu.

4.2.2 Hyobranchiální skelet



Tabule 31: Experiment 8, kontrola, 4 dny, skelet. A) - Hyobranchiální skelet kontrolních embryí v 0,2% roztoku DMSO. B) - Hyobranchiální embryí vystavených inhibitoru AGN194310 po dobu 3 dnů. 3 dny postačují k aktivaci vývojového programu elementů hypobranchiale 3 a ceratobranchiale 5. hb2 - hypobranchiale 2, hb3 - hypobranchiale 3, cb4 - ceratobranchiale 4, cb5 - ceratobranchiale 5. Vnější fenotyp je zachycen na tabulích 29 a 28.

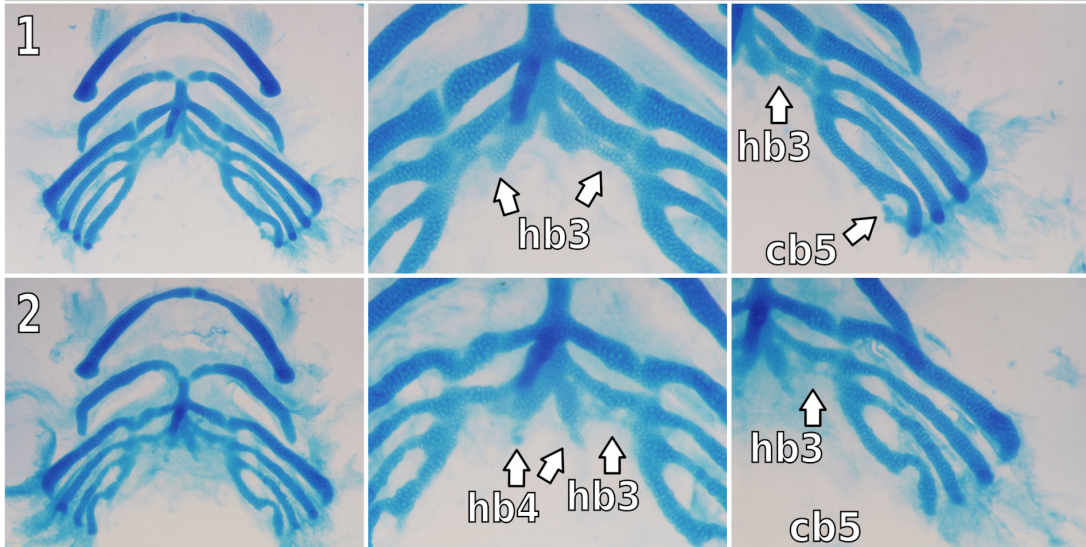
AGN194310, 4d



Tabule 32: Experiment 8, 4 dny, skelet. Embryo 1 neprošlo rozpuštěním tkání v trypsinu. Vnější žábra se nachází na čtvrtém branchiálním oblouku, v němž se zároveň nachází deformované ceratobranchiale 4. Dole: hyobranchiální skelet embryí vypreparovaný pomocí trypsinu. hb3 - hypobranchiale 3, cb4 - ceratobranchiale 4, cb5 - ceratobranchiale 5. U těchto embryí je zároveň přítomna žábra na čtvrtém branchiálním oblouku. Ceratobranchiale je v případě jedince 4 plně srostlé na obou stranách. Vnější fenotyp je zachycen na tabulích 27 a 26.

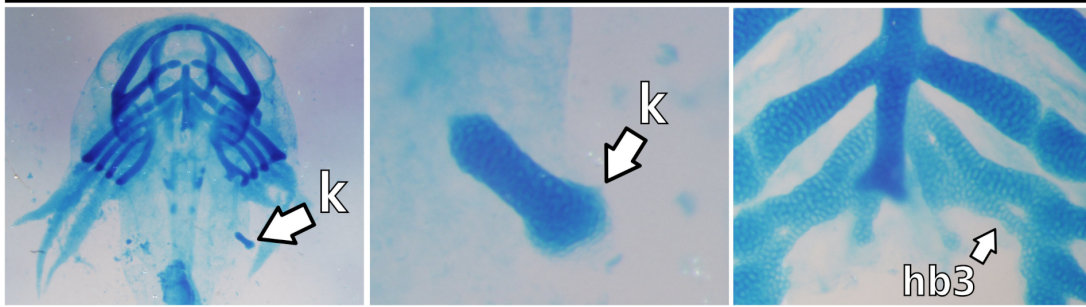
A)

AGN194310, 5d



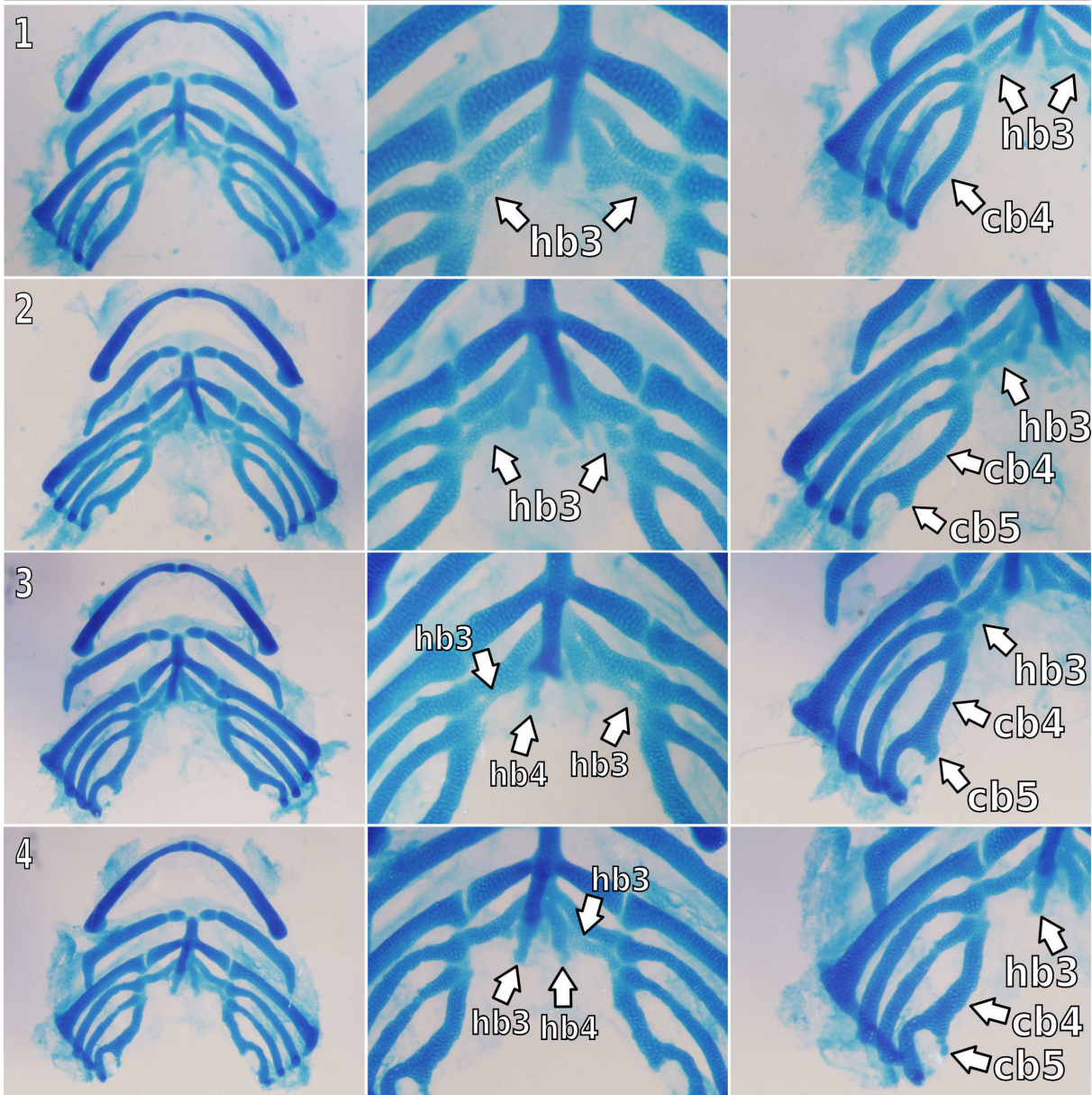
B)

AGN194310, 6d



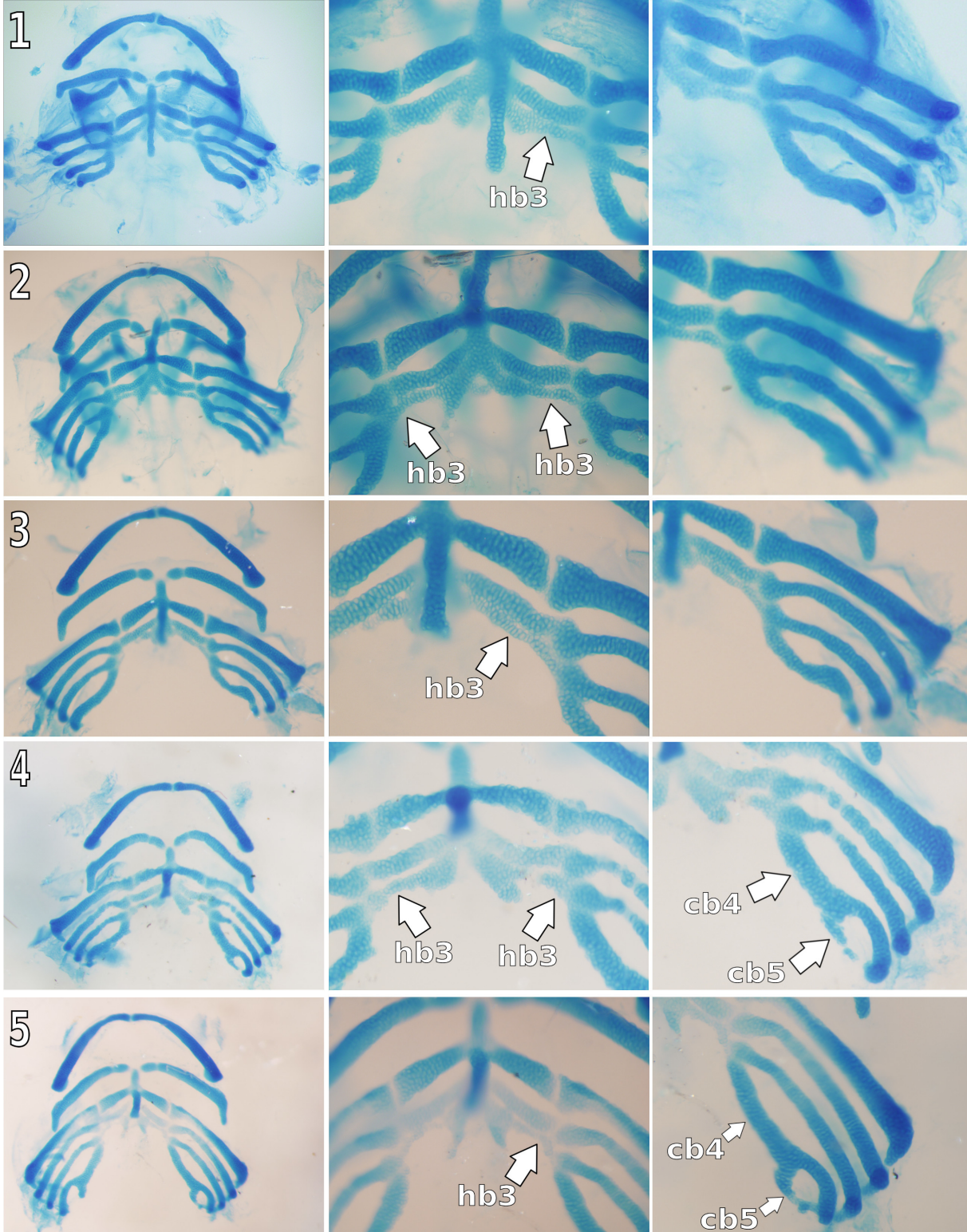
Tabule 33: A) - hyobranchiální skelet embryí vystavených inhibitoru AGN194310 po dobu 5 dnů z 12. hb3 - hypobranchie 3, cb4 - ceratobranchie 4, cb5 - ceratobranchie 5. 1 - ceratobranchie 5 je téměř plně srostlé s distálním koncem ceratobranchie 4. 2 - ceratobranchie 5 je jen slabě vyvinuté, ale anteriorní ohyb ceratobranchie 4 je přítomný. Hypobranchie 4 vzniká neúplně. B) - hyobranchiální skelet po vystavení inhibitoru AGN94310 po dobu 6 dní z 12. Tento jedinec má zároveň transformace hyobranchiálního skeletu a předčasně se vyvíjející končetiny. hb4 - hypobranchie 3. hb3 - hypobranchie 3, cb4 - ceratobranchie 4, cb5 - ceratobranchie 5. k - skeletogenní koncentrace chondroblastů uvnitř základu končetiny. Vnější fenotyp podobných předčasných končetin zobrazuje Tabule 28. Stejný jedinec jako v části B) je zobrazen na tabuli 34, 3.

AGN194310, 6d



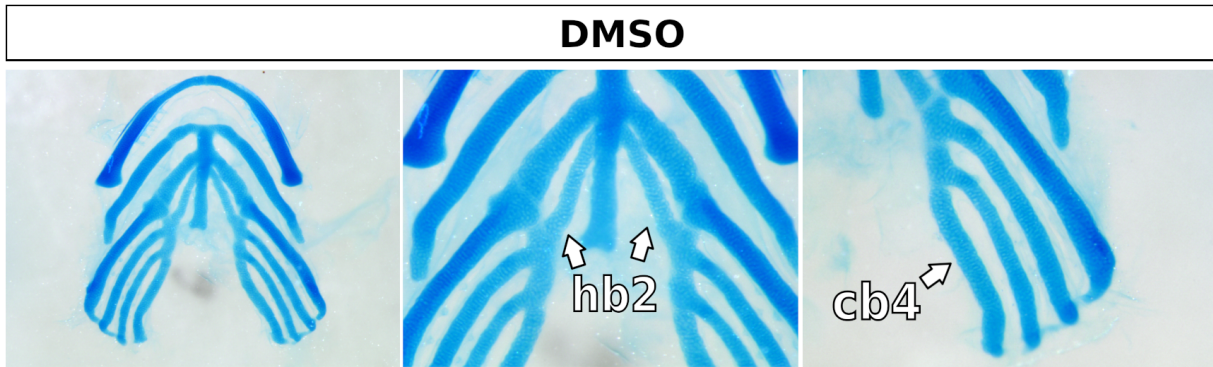
Tabule 34: Hyobranchiální skelet po vystavení inhibitoru AGN94310 po dobu 6 dní z 12. hb2- hypobranchiale 2, hb3 - hypobranchiale 3, cb4 - ceratobranchiale 4, cb5 - ceratobranchiale 5. Ceratobranchiale 5 vykazuje u jednotlivých jedinců rozdílný stupeň vývoje. Je patrná progresse ve vývoji ceratobranchiale 5 od jedince 1 k jedinci 5. U jedince 3 se také nacházela předčasná přední končetina zobrazená na tabuli 33, B.

AGN194310, 12d

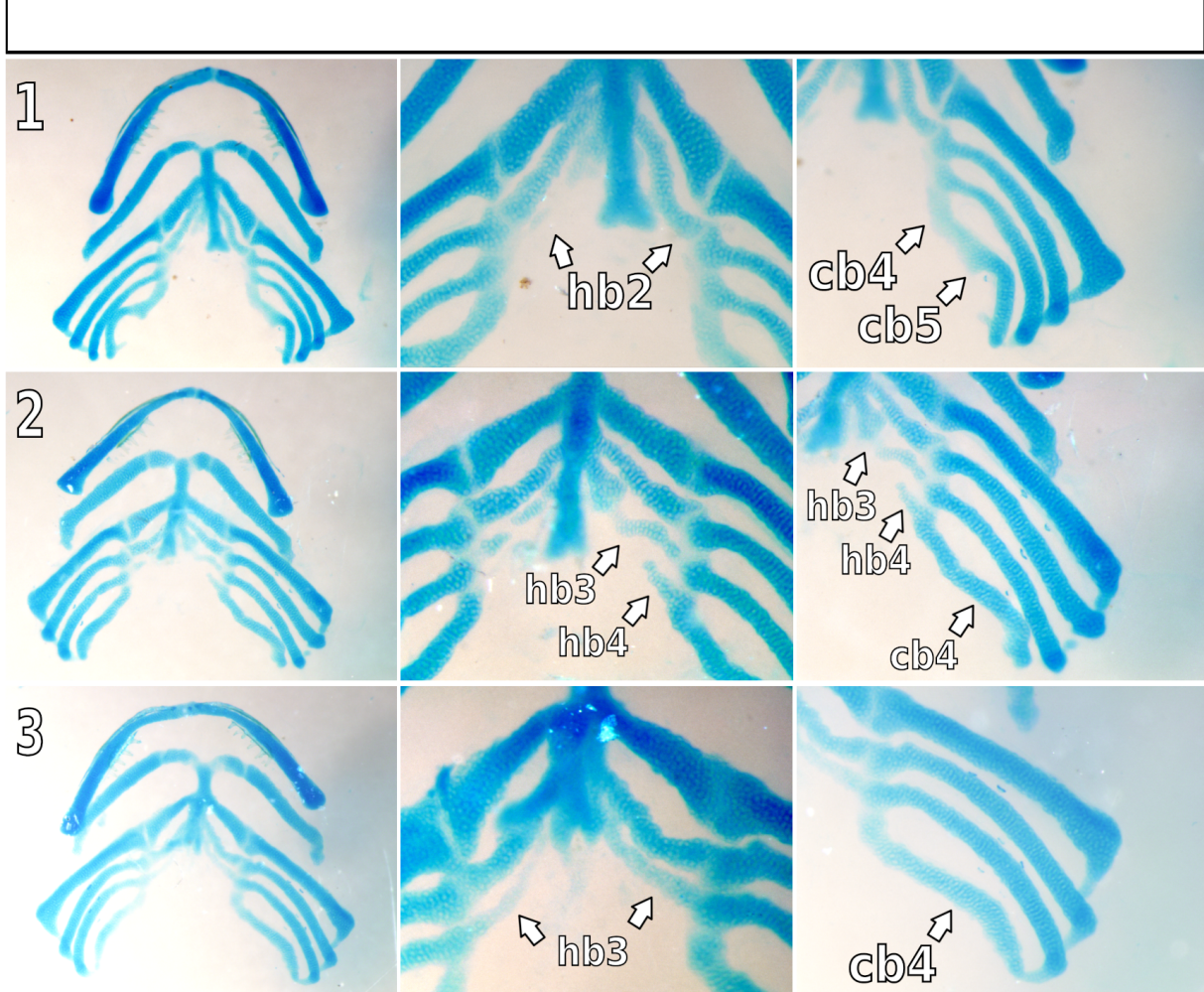


Tabule 35: Hyobranchiální skelet embryí vystavených inhibitoru AGN194310 pod dobu 12 dnů. hb3 - hypobranchiale 3, cb4 - ceratobranchiale 4, cb5 - ceratobranchiale 5. Ceratobranchiale 5 vykazuje rozdílný stupeň vývoje. U všech zobrazených embryí je patrné hypobranchiale 3. Snímky jedinců 1-5 ukazují progresi ve vývoji ceratobranchiale 5. U jedince 5 je ceratobranchiale 5 plně srostlé. Vnější fenotyp ukazuje Tabule 24 a Tabule 25.

A)

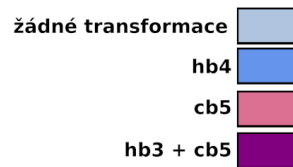


B)

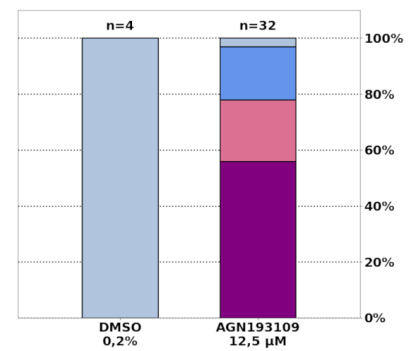


C)

látka	konc.	celkem	0		hb3		cb5		hb3 + cb5	
			n	%	n	%	n	%	n	%
AGN193109	12,5 μ M	33	1	3	6	19	7	22	18	56
DMSO	0,2 %	4	4	100	0	0	0	0	0	0



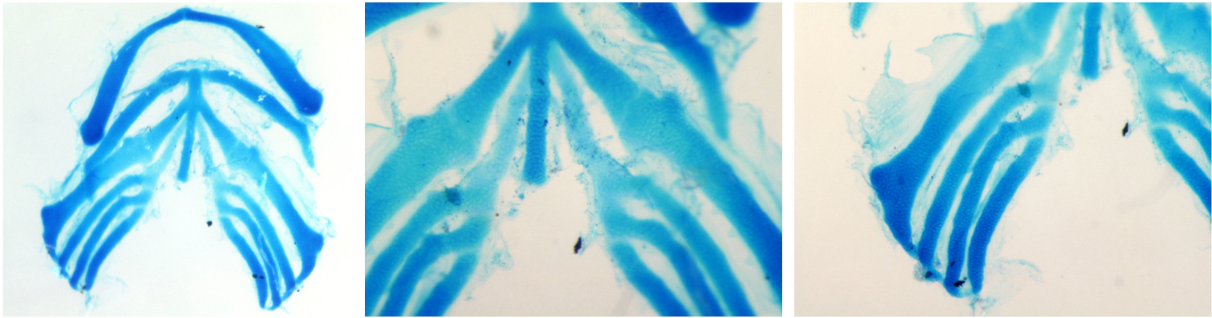
D)



Tabule 36: Experiment 3, skelet. A) - hyobranchiální skelet kontrolní skupiny v 0,2% DMSO. B) - hyobranchiální skelet larev axolotla, která byla vystavena inhibitoru AGN193109 po dobu 12 dnů počínaje stádiem 35 barvený alciánovou modří. Komplementární snímky vnějšího fenotypu jsou zachyceny na tabulích 13 a 14. C) - tabulka četnosti. D) - graf. hb2 - hypobranchiale 2, hb3 - hypobranchiale 3, hb4 - hypobranchiale 4, cb4 - ceratobranchiale 4, cb5 - ceratobranchiale 5. Skelet 1 je příkladem ceratobranchiale 5. Ve skeletu 2 se nachází hypobranchiale 4, které se plně nenapojuje na basibranchiale.

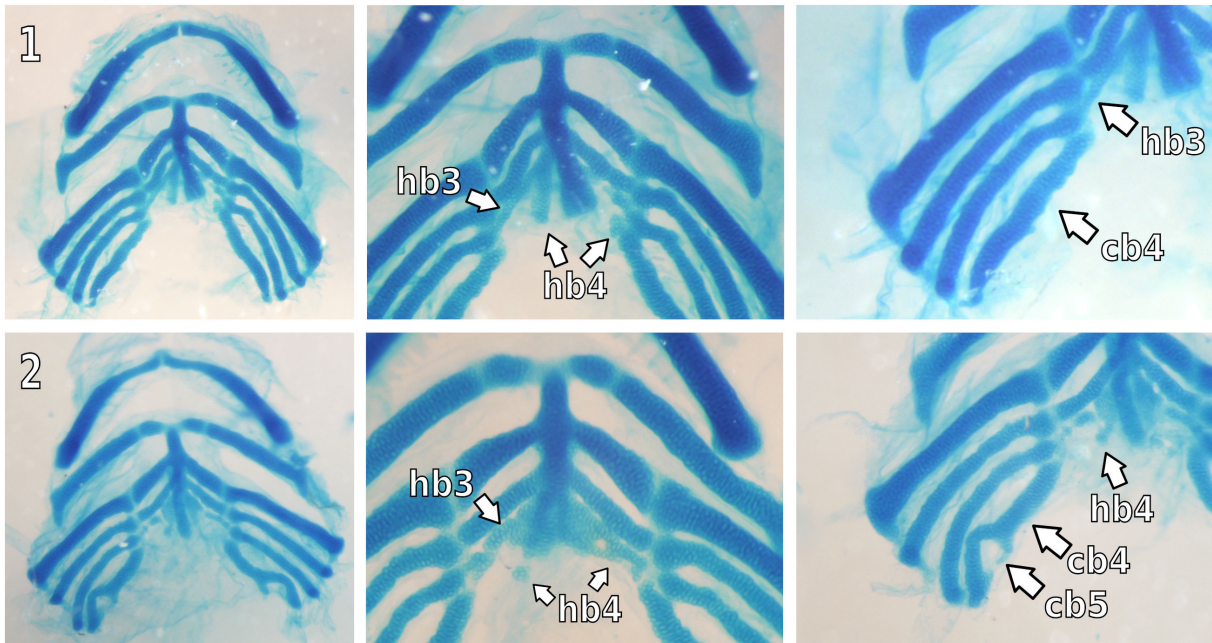
A)

DMSO



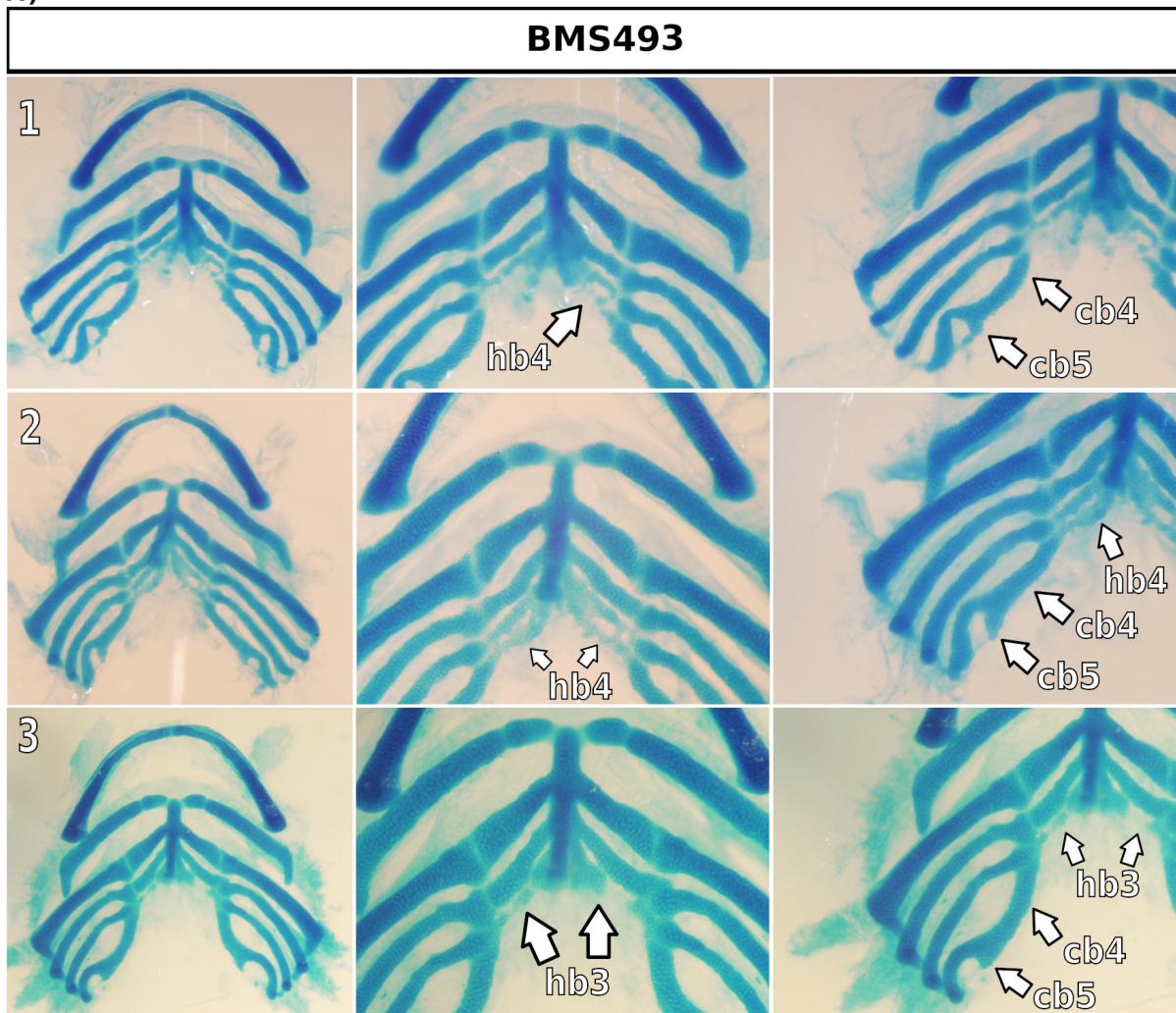
B)

BMS493



Tabule 37: Experiment 4, skelet (1 . část). A) - kontrolní skupina v 0,2% roztoku DMSO. B) - hypobranchiální skelet larev axolotla, která byla vystavena inhibitoru BMS493 v koncentraci 7,5 μ M po dobu 12 dní počínaje stádiem 35. Vnější fenotyp zobrazuje obrázek 15. hb3 - hypobranchiale 3, hb4 - hypobranchiale 4, cb4 - ceratobranchiale 4, cb5 - ceratobranchiale 5. Hypobranchiale 4 se ani v jednom ze zobrazených případů plně nenapojuje na basibranchiale. Ceratobranchiale jedince 2 je téměř úplně srostlé. Vnější fenotyp zobrazuje Tabule 15.

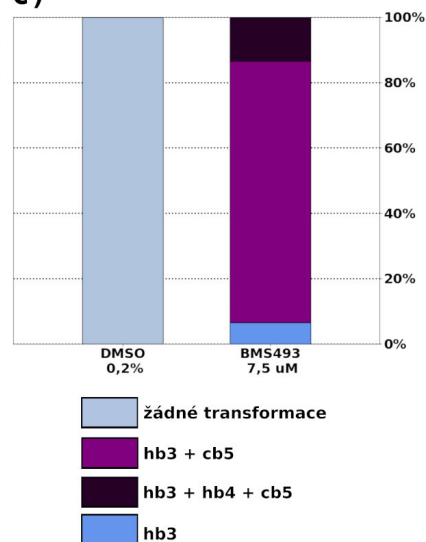
A)



B)

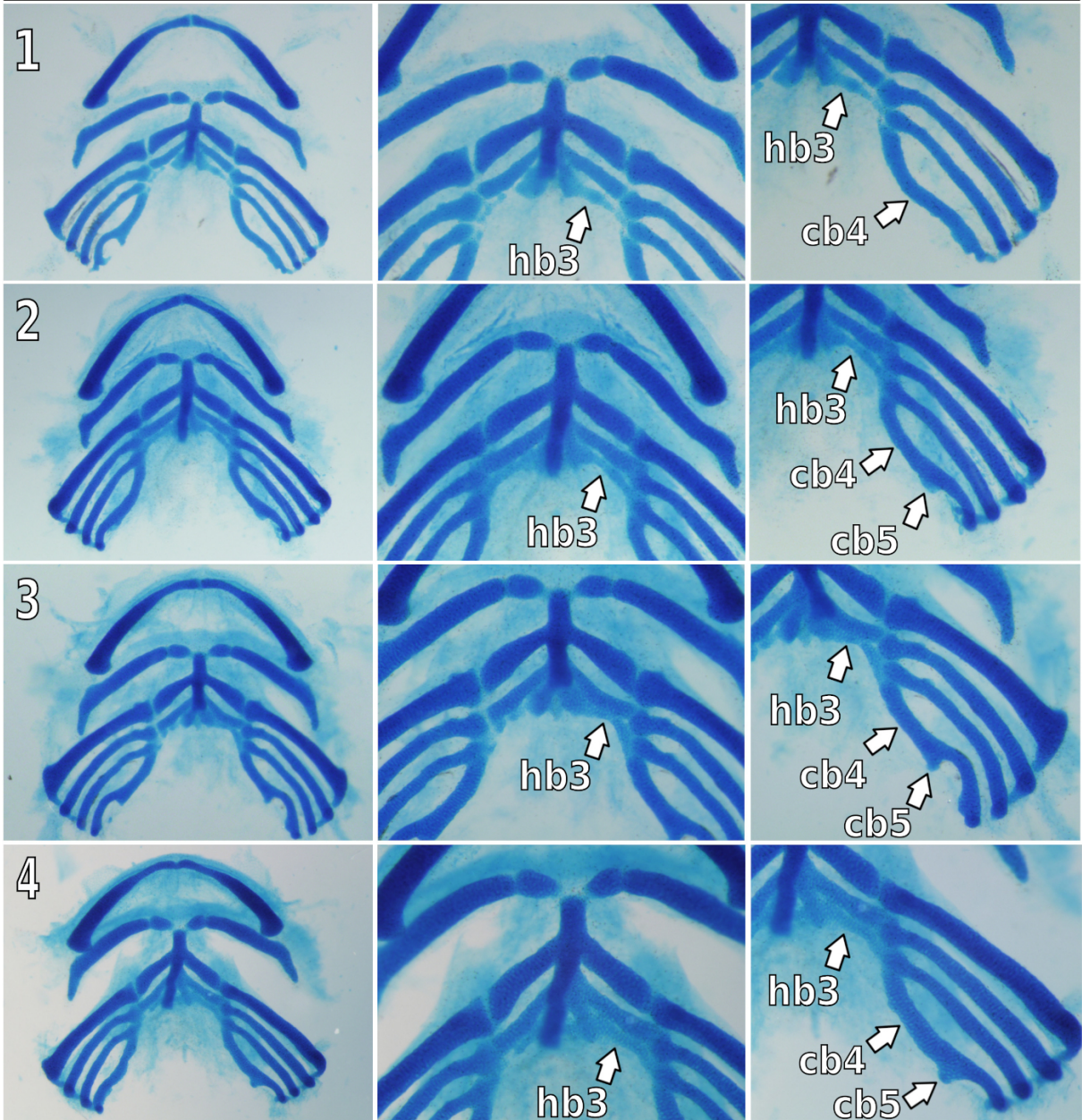
látka	konc.	celkem		žádné změny		hb3		cb5		hb3+cb5		hb3+hb4+cb5	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
BMS493	7,5 μ M	15		0	0	1	6,66	0	0	12	80	2	13,33
DMSO	0,2 %	4		4	100	0	0	0	0	0	0	0	0

C)



Tabule 38: Experiment 4, skelet (2 . část). A) - hyobranchiální skelet larev axolotla, která byla vystavena inhibitoru BMS493 po dobu 12 dní počínaje stádiem 35. B) - tabulka četností. C) - graf četností jednotlivých fenotypů. hb3 - hypobranchiale 3, cb4 - ceratobranchiale 4, cb5 - ceratobranchiale 5. U těchto embryí je zároveň přítomna žábra na čtvrtém branchiálním oblouku. Vnější fenotyp zobrazuje Tabule 15.

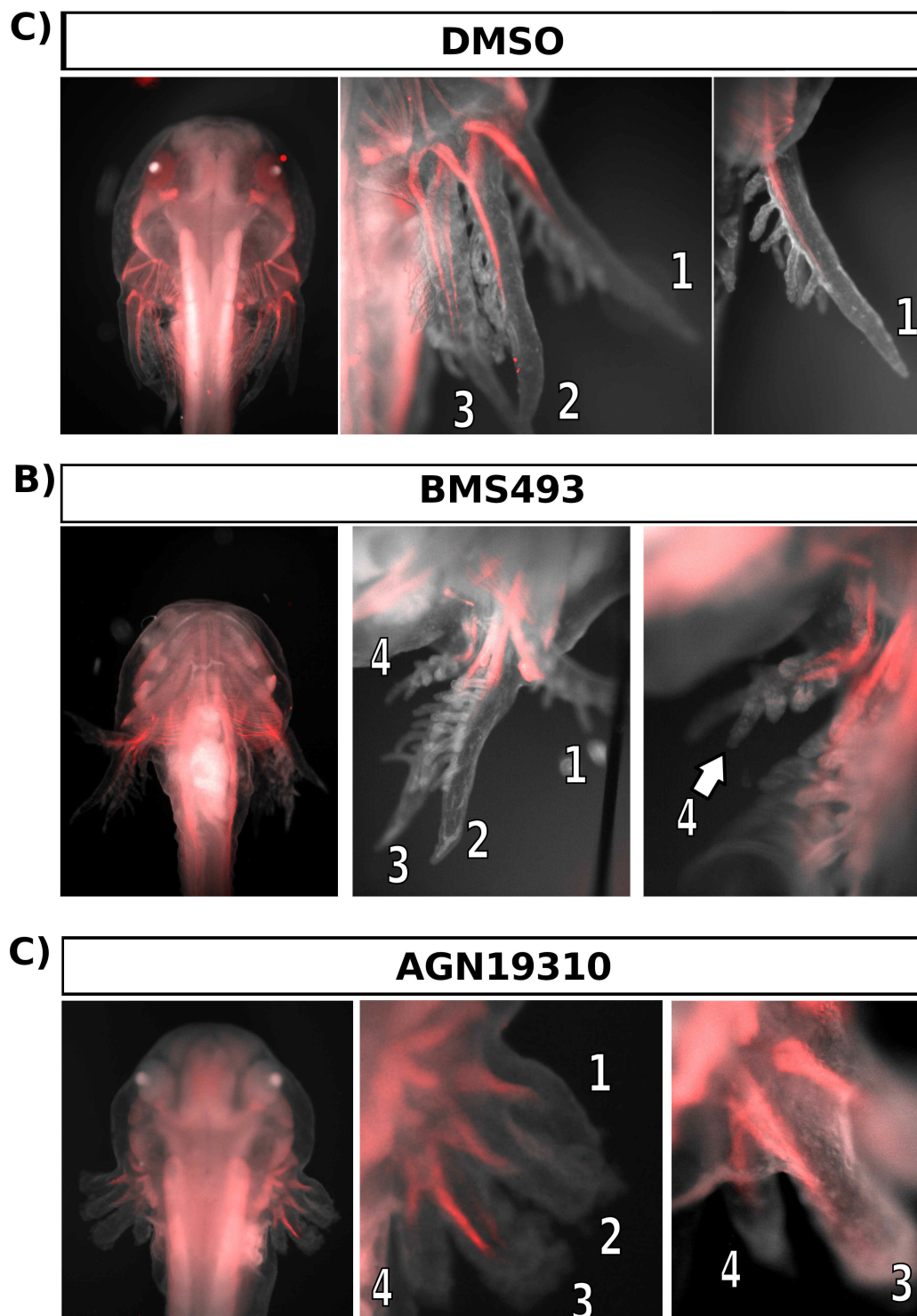
AGN194310



Tabule 39: Experiment 4, skelet (3 . část). Hyobranchiální skelet po inhibici receptorů RAR pomocí AGN194310 v koncentraci 0,8 μ M po dobu 12 dní. hb3 - hypobranchiale 3, cb4 - ceratobranchiale 4, cb5 - ceratobranchiale 5. Všechny vyobrazené skelety obsahují hypobranchiale 3 a ceratobranchiale 5. U těchto embryí je zároveň přítomna žábra na čtvrtém branchiálním oblouku. Vnější fenotyp stejné experimentální skupiny zobrazuje Tabule 16.

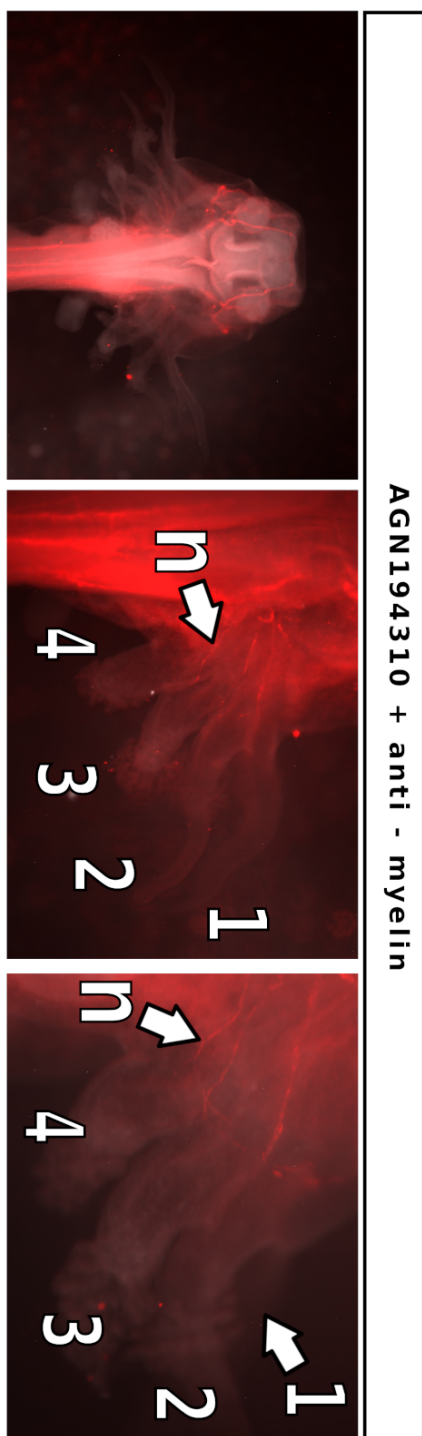
4.3 Imunohistochemie struktur v indukovaných žábách

4.3.1 Imunohistochemie svalů v indukovaných žábách



Tabule 40: Experiment 5, protilátka 12/101. A) - kontrolní skupina. B) - skupina vystavená BMS493 v koncentraci 7,5 μM po dobu 12 dnů. C) - skupina vystavená AGN194310 v koncentraci 1,6 μM po dobu 12 dnů. 1 - první pár žaber, 2 - druhý pár žaber, 3 - třetí pár žaber, 4 - čtvrtý pár žaber. Indukovaná 4. žábra obsahuje svaly.

4.3.2 Imunohistochemie nervů v indukovaných žábách



Tabule 41: Protilátka anti-myelin. Indukovaná žába obsahuje nerv. n - nerv, 1 - první pár žaber, 2 - druhý pár žaber, 3 - třetí pár žaber, 4 - čtvrtý pár žaber.

5 Diskuse

5.1 Inhibice RAR vede k indukci ektopických orgánů

Analýza genové exprese genu *Cyp26b* ukazuje, že tento gen je přítomen v základech vnějších žaber po celou dobu vývoje orgánu, zatímco *Raldh2* se objevuje ve vnějších žábřích až v pozdějších stádiích (st.37), a to ve špičkách každé vnější žábry a na posteriorní straně báze každé vnější žábry, ale už ve stádiích před vznikem základů vnějších žaber je přítomen *Raldh2* v somitech posteriorně od základu končetiny, a tudíž posteriorně od faryngeální oblasti (Tabule

V této práci byly testovány tři inhibitory všech receptorů RAR (α , β a γ) z hlediska jejich efektu na vývoj vnějších žaber axolotla. Všechny tři testované inhibitory způsobují v principu stejný efekt na vývoj embryí axolotla, který se v první řadě vyznačuje indukcí vývoje ektopických orgánů v podobě vnější žábry na čtvrtém branchiálním oblouku a transformacemi hyobranchiálního skeletu branchiálních oblouků.

V této práci bylo dále předloženo několik typů analýz ukazujících, že indukovaná struktura na čtvrtém branchiálním oblouku skutečně je vnější žábrou, která má v mnoha případech externí morfologické znaky typické pro vnější žábry a zároveň obsahuje svalovou a nervovou tkáň stejně jako normálně se vyvíjející žábry. Ve většině případů je přítomnost vnějších žaber čtvrtého páru také doprovázena transformacemi hyobranchiálního skeletu, které mají přinejmenším formu alespoň částečné unilaterální nebo bilaterální duplikace hypobranchiálního elementu, který se v těchto případech vyvíjí také na třetím branchiálním oblouku, a ne pouze na prvním a na druhém branchiálním oblouku, jak je tomu u normálních jedinců. Tento element, který je možné označovat jako hypobranchiale 3 nebyl dosud u larev axolotla mexického zdokumentován, ale vyskytuje se u jiných skupin skupin obojživelníků buď jako regulerní znak, anebo jako vzácná vnitrodruhová variabilita (dále v oddílu 5.4). Transformace skeletu jsou v obou kvantifikovaných experimentech podobně časté jako indukce vnějších žaber a i v experimentech 2 a 3 (Tabulka 1), při nichž byla indukována pouze rudimentální čtvrtá žábra, došlo v některých případech ke vzniku plně zformovaných elementů hypobranchiale 3 (Tabule 36, B). V nejextrémnějších případech inhibice receptorů kyseliny retinové vyvolává spolu s vnější žábrou také transformace čtvrtého branchiálního oblouku, který je v takových případech také spojený s basibranchiale prostřednictvím indukovaného elementu hypobranchiale 4 (Tabule 38 2 a 3).

Přítomnost pravidelně vznikajících ektopických orgánů následkem chemické inhibice receptorů kyseliny retinové může mít implikace především pro evoluci obojživelníků, ale také pro pochopení molekulární regulace segmentace obratlovců jako takové.

5.2 Iniclace vnějších žaber vyžaduje inhibici kyseliny retinové

In situ hybridizace ukázala, že základy vnějších žaber exprimují gen *Cyp26b*, ale čtvrtý branchiální oblouk *Cyp26b* neexprimuje. Samotná aktivita *Cyp26b* ve vnějších žábách by mohla naznačovat, že se jedná o nutný faktor pro vývoj vnějších žaber, ale toto tvrzení je třeba opřít o výsledky funkčních experimentů, které následovaly po úvodních analýzách genové exprese. Inhibitory receptorů kyseliny retinové by měly mít stejný efekt na tkáň jako produkt genu *Cyp26b* v tom smyslu, že jak metabolizace kyseliny retinové na neaktivní produkty, tak blokáce receptorů vedou ke stejnému výsledku, kterým je zamezení receptorů kyseliny retinové aktivovat geny, které jsou řízeny cis-regulačním elementem RARE. Inhibice receptorů kyseliny retinové by tak měla mít za následek aktivaci vývojového programu vnější žábry na čtvrtém branchiálním oblouku, je-li odstraněna aktivita kyseliny retinové. Kyselina retinová by proto byla nezbytným a zároveň postačujícím faktorem vývoje vnějších žaber. Aplikace látek, které jsou experimentálně ověřenými inhibitory těchto receptorů skutečně vedla k indukci vnější žábry na čtvrtém branchiálním oblouku, a tudíž bylo potvrzeno, že signalizace kyseliny retinové zabraňuje v normálním stavu vývoji vnějších žaber. Tento inhibiční efekt kyseliny retinové na zakládání vnějších žaber je v normálním stavu kontrolován právě aktivitou *Cyp26b*, který ovšem ve čtvrtém branchiálním oblouku není aktivní. Čtvrtý branchiální oblouk je zároveň nejblíže k zóně aktivity genu kódujícího retinaldehyd dehydrogenázu *Raldh2*, který je markerem produkce kyseliny retinové. Je proto pravděpodobné, že poslední branchiální oblouk je kvůli blízkosti trupových somitů a základu končetiny také vystaven nejvyšší koncentraci kyseliny retinové. Vývojový program vnější žábry je v posledním branchiálním oblouku tudíž pravděpodobně inhibován jak vyšší koncentrací kyseliny retinové, tak absencí aktivity *Cyp26b*. Syntetické inhibitory tak mohou úspěšně nahradit endogenní represi signalizace kyseliny retinové i v posledním oblouku, což je možné doložit pozitivním efektem, tj. efektem, který spočívá v přítomnosti struktur, které v normálním stavu chybějí. Přítomnost anteroposteriorního gradientu vznikajícího díky somitům je plně v souladu s daty získanými na jiných obratlovčích modelech, především na *Danio rerio* (Gibert et al., 2006), (Begemann et al., 2001).

5.3 Po inhibici RAR dochází k homeotické transformaci faryngových oblouků

Některá experimentální embrya vykazují jak přítomnost vnější žábry na čtvrtém branchiálním oblouku, tak přítomnost hypobranchiale 3 ve skeletu každého branchiálního oblouku. Poslední branchiální oblouk axolotla v normálním stavu nemá vnější žábru a skelet posledních dvou oblouků sestává v normálním stavu pouze z jednoho ceratobranchiálního chrupavčitého elementu, který se nenapojuje na basibranchiale, protože hypobranchialia v těchto obloucích chybějí. V nejextrémnějším případě inhibice RAR tak získávají všechny branchiální oblouky stejné vnitřní i vnější morfologické charakteristiky. Jednotlivé branchiální segmenty tudíž úplně nebo částečně ztrácejí svoji unikátní segmentární identitu a stávají se víceméně morfologicky uniformními. Jedná se proto za celkem jasný příklad homeotické transformace v Batesonově smyslu (oddíl 1.2.3). Kyselina retinová je tudíž faktorem, který je zodpovědný za to, že jednotlivé branchiální oblouky v normálním stavu nejsou stejné, protože po inhibici receptorů RAR se rozdíl mezi jednotlivými segmenty ve větší nebo menší míře stírají a v nejextrémnějších případech mizí úplně.

Uniformitě segmentů by se ovšem mohla vymykat transformace elementu ceratobranchiale 4, která je ve větší nebo menší míře přítomná u většiny studovaných jedinců. V tomto smyslu hyobranchiální skelet uniformní není a z hlediska ceratobranchiale je dokonce méně uniformní než u normálních jedinců, pokud ale nebude tato transformace interpretována jako posteriorní prodloužení hyobranchiálního skeletu skrze přidání jednoho posteriorního segmentu. Příčiny anteriorního ohybu ceratobranchiale nejsou jasné a jejich stanovení by vyžadovalo další analýzy. Nabízí se spekulativní vysvětlení, podle kterého by byla jeho příčinou zrychlená proliferace chondroblastů, které by mělo za následek ohýbání struktury. V této souvislosti byla právě diferenciální proliferace chondroblastů popsána jako jeden z mechanismů morfologických změn v hyobranchiálním skeletu (Rose, 2009). Hlavním argumentem pro klasifikaci tohoto znaku jakožto ceratobranchiale 5 je však jeho silná podobnost s fenotypy pozorovanými u obojživelníků čeledi Plethodontidae, byť na třetím branchiálním oblouku (oddíl 5.4.1), (Obrázek

Tyto výsledky představují vůbec první příklad homeotické transformace, která postihuje branchiální oblouky, to znamená jiné faryngové oblouky než mandibulární a hyoidní, jejichž regulace z hlediska genů *Hox* byla experimentálně studována a některé faktory zodpovídající za jejich morfologickou a funkční diferenciaci byly identifikovány (kapitola

1.2.3).

Je pravděpodobné, že také homeotické transformace zdokumentované v této práci obnášejí změny v expresi genů *Hox* vzhledem k tomu, že interakce mezi kyselinou retinovou a geny *Hox* byly prokázány v případě homeotických transformací trupových segmentů, ale potvrzení této hypotézy by vyžadovalo podrobnější analýzy genové exprese v kombinaci se zde popsanými inhibičními experimenty.

5.4 Indukované struktury korespondují se znaky jiných skupin obratlovců

5.4.1 Neontologické souvislosti

Ačkoli jsou experimentálně indukované struktury na těle axolotla součástí jednoznačně teratogenního fenotypu, který pravděpodobně lze označit za syndrom deficiencie vitamínu A (Chen et al., 2001) včetně kraniofaciálních deformací a defektního vývoje očí, tak se nejedná o prostou patologickou deformaci bez evolučního kontextu. Indukované znaky totiž topologicky a morfologicky korespondují s fenotypy známými u jiných obojživelníků a příbuzných fylogenetických skupin. Ani čtvrtý pár vnějších žaber ani skeletální elementy hypobranchiale 3 a hypobranchiale 4 nebyly dosud u axolotla mexického v odborné literatuře popsány a v souladu s očekáváním se nevyskytují ani u žádného ze studovaných kontrolních embryí, ale jsou známy u jiných skupin obojživelníků buď jako charakteristický fylogenetický znak, anebo jako vzácná vnitrodruhová variabilita. Během evoluce ocasatých také pravděpodobně docházelo ke ztrátám a opětovnému vzniku chrupavek hyobranchiálního skeletu.

V normálním stavu jsou u podřádu Salamandroidea k mediálnímu elementu basibranchiale připojeny elementy ceratobranchiale prostřednictvím elementu hypobranchiale pouze pokud se jedná o elementy prvního a druhého branchiálního oblouku. Existuje tudíž pouze hypobranchiale 1 a hypobranchiale 2 zatímco ceratobranchiale 3 a 4 se na basibranchiale nenapojují. Ve většině případů embryí axolotla, která prošla inhibicí receptorů kyseliny retinové, se vyskytuje úplně nebo částečně vyvinutý element hypobranchiale 3 a vzácněji také hypobranchiale 4.

V případě duplikací hypobranchiálních skeletálních elementů se nabízí srovnání s kryptobranchoidní linií ocasatých, konkrétně s larvami čeledi Hynobiidae, jejichž hypobranchiální skelet je téměř identický se skeletem larev axolotla s tou výjimkou, že se u nich typicky vyskytují rudimentární elementy hypobranchiale 3, které se ovšem nenapojují na

mediální element basibranchiale (Obrázek 4,b,c).

V minulosti byla otázka počtu hypobranchiálií larválního skeletu u různých skupin ocasatých předmětem zájmu zoologů a embryologů. Element hypobranchiale 3 byl popsán u druhu *Hynobius nebulosus* (Hynobiidae) (Edgeworth, 1923), (Boy, 1974) a popisu tohoto elementu u druhu *Onychodactylus japonicus* (Hynobiidae) je věnována specifická publikace (Okajima, 1922). Celkově je možné říci, že přítomnost hypobranchiale 3 je v krypto-branchodní linii pravidelností, zatímco u zástupců salamandroidní linie, do níž patří také axolotl, bylo hypobranchiale 3 popsáno pouze jako vzácná vnitrodruhová variabilita, která byla pozorována u jedinců druhů *Salamandra salamandra* (Kallius, 1901) *Notophtalmus viridescens* (Rose, 2003) (Obrázek 9) a *Ambystoma maculatum* (Rose, 2003). Rose (2003) přitom pokládá přítomnost všech čtyř hypobranchiálií za primitivní stav hypobranchiálního skeletu obojživelníků, a proto označuje hypobranchiale 3 vyskytující se u těchto druhů jako atavistický znak. Je možné, že jedinci s tímto fenotypem byli ovlivněni sníženou měrou signalizace kyseliny retinové, ať už následkem genové mutace nebo deficitu vitamínu A. Inhibice kyseliny retinové u axolotla tudíž podle takové interpretace vede k obnově atavistických znaků.

Nejvíce relevantním příkladem pro interpretaci výsledků této práce je stav pozorovaný u pamloka džungarského *Ranodon sibiricus* (Hynobiidae) (Obrázek 5). Je pozoruhodné, že u druhu *Ranodon sibiricus* byly jako u jediného obojživelníka popsány zároveň obě struktury, které byly indukovány v experimentech zdokumentovaných v této práci. Skelet těchto embryí v souladu s ostatními známými příslušníky čeledi Hynobiidae obsahuje hypobranchiale 3 (Boy, 1974), ale zároveň je *Ranodon sibiricus* jediným ocasatým, u něhož byla zdokumentována žábra na čtvrtém branchiálním oblouku (Shmalgauzen, 1968). Existuje tudíž evidence svědčící o tom, že tyto dva fenomény jdou ruku v ruce nejen v experimentální situaci, ale také v přírodě. Tato žábra dosahuje přibližně podobného stupně vývoje jako experimentálně indukovaná žábra zobrazená na Tabuli 24.

Přítomnost obou znaků u embryí, která podstoupila byť jen dočasnou inhibici receptorů kyseliny retinové, může poukazovat na to, že rozdíly v morfologii larválního skeletu ocasatých obojživelníků (Schwarz et al., 2023) je potenciálně možné vysvětlit rozdílnou měrou signalizace kyseliny retinové. Některé případy ektopické vnější žábry u experimentálních embryí (např. Tabule 24) přibližně odpovídají rudimentárnímu stavu, který byl popsán u pamloka džungarského *Ranodon sibiricus*, ale u mnoha případů představují plně vyvinutý orgán opatřený žaberními filamenti obsahující svaly a nervy. Takovýto fenotyp odpovídá stavu pozorovaném na bahnících, jejichž larvy mají čtyři páry vnějších žaber

(Obrázek 6).

Co se týče transformace ceratobranchiale 4, které se v mnoha případech vidličnatě rozvětjuje, je možné nalézt určité paralely se stavem, který je pozorován u ocasatých obojživelníků čeledi Plethodontidae. Nejnázornější případ takové variability popsal Rose (1995) na jedincích druhu *Hemidactylium scutatum*. Pro čeleď Plethodontidae je charakteristická redukce posteriorních elementů hyobranchiálního skeletu, která se vyznačuje zmenšením nebo úplnou absencí ceratobranchiale 4. Podle Rose (1995) se rudimentární ceratobranchiale 4 vyskytuje u 45 ze 49 jedinců *H. scutatum* studovaných v dotyčné publikaci. V některých případech se rudimentární ceratobranchiale 4 napojuje pouze na posteriorní konec ceratobranchiale 3, ale v některých případech srůstá anteriorně. Tato situace se podobá transformaci ceratobranchiale 4, která se objevuje ve vysokém procentu případů zdokumentovaných v této práci. Jedinci *H. scutatum*, kteří mají rudimentární ceratobranchiale 4, ale nemají žaberní štěrbinu posteriorně od ceratobranchiale 3 podobně jako experimentální embrya axolotla nemají žaberní štěrbinu posteriorně od ceratobranchiale 4 i tehdy, když se z ceratobranchiale 5 odvětjuje nově indukovaná struktura, jak je patrné na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu (Tabule 29 a 27). Na embryích axolotla je proto možné pozorovat stav, který je podobný stavu u larev *H. scutatum*, ale je posunutý o jeden segment posteriorně. Embrya příslušníků čeledi Plethodontidae s přímým vývojem, např. *Plethodon cinereus*, mají naopak podobný stav posunutý o jeden segment anteriorně (Rose, 2014). V souvislosti s výsledky této práce je relevantí studie týkající se evoluce hyobranchiálního skeletu uvnitř čeledi Plethodontidae, kterou publikoval Kerney et al. (2012). Uvnitř čeledi Plethodontidae došlo opakovaně ke vzniku ontogeneze s přímým vývojem a na základě molekulární fylogenetiky se zdá, že v případě rodu *Desmognathus* došlo i k návratu k bifazickému životnímu cyklu s akvatickými larválními stádii. Larvy rodu *Desmognathus* zároveň mají v hypobranchiálním skeletu rudimentární ceratobranchiale 4⁴, které se u jejich předků s přímým vývojem nevyskytuje. Pokud je rod *Desmognathus* skutečně odvozeným taxonem, u něhož došlo k reevoluci larválních stádií a s nimi spojeného prodlouženého hyobranchiálního skeletu, jednalo by se o porušení takzvaného Dollova pravidla. Dollovo pravidlo říká, že reevoluce anatomických znaků je velmi nepravděpodobná, a je obecně akceptováno jako princip, na základě kterého se vyhodnocuje příbuznost taxonů, jsou-li k dispozici pouze morfologické znaky. Kerney et al. (2012) ale tvrdí, že Dollovo pravidlo je v tomto případě přece jen zachováno, neboť se nejedná o skutečnou reevoluci znaku, ale o pouhé pokračování vývojového programu,

⁴Kerney označuje ceratobranchiale jako epibranchiale.

který se silněji projevoval u linií s akvatickým vývojem jakou je *Plethodon cinereus*. Byl ale stále latentně přítomen u larev plethodontidů s přímým vývojem, kteří byly předky rodu *Desmognathus*, u něhož tento vývojový program dostal znovu příležitost se plně projevit spolu s opětovným získáním akvatického stádia. Výsledky této práce poskytují potenciální vývojový mechanismus vysvětlující variabilitu uvnitř plethodontidů, neboť ukazují, že k extenzi a kompresi hyobranchiálního skeletu během vývoje může docházet v následku změn v intenzitě signalizace kyseliny retinové, která může rozhodovat o tom, do jaké míry se latentní vývojový program projeví. Kyselina retinová a geny, které ji regulují, jsou proto možnou kandidátní příčinou některých situací zdánlivě odporujících Dollovu pravidlu.

5.4.2 Paleontologické souvislosti

Experimentální ovlivňování signalizační dráhy kyseliny retinové vedlo ke vzniku skeletálních elementů podobných těm, které byly u předků axolotla mexického ztraceny během evoluce. K divergenci linie vedoucí ke kryptobranchoidům, tj. k čeledím Hynobiidae a Cryptobranchidae, došlo podle většiny fylogenetických studií v geologickém období jury (Gao & Shubin, 2003),(Gao & Shubin, 2012). V embryu axolotla je tudíž stále přítomný potenciál pro vývoj struktur, které byly ztraceny před více než 140 miliony let, neboť nejstarší popsany zástupce salamandroidní linie ocasatých, neotenický *Beiyuanerpeton jianpingensis*, (Gao & Shubin, 2012) už měl pouze dva páry hypobranchiálií (hypobranchiale 1 a hypobranchiale 2).

Ztráta hypobranchiale 4, které bylo také indukováno ve výše popsaných experimentech je rovněž událostí, ke které došlo v linii vedoucí k současných ocasatým ještě dřív. Hypobranchiale 4 se totiž nevyskytuje už ani u prvohorních temnospondylů (Schoch & Witzmann, 2024), Witzmann & Brainerd (2017), a je naposledy přítomno u fosílie *Tiktaalik rosae* staré kolem 360 milionů let (Witzmann, 2013). Witzmann (2013) také popisuje plesiomorfním stav hyobranchiálního skeletu jako rybovitý (*fish-like*). Lze říci, že v rámci experimentů dokumentovaných v této práci bylo dosaženo větší nebo menší míry obnovení plesiomorfního rybovitého typu skeletu, který je patrný například u tiktaalika (8), ale u žádných recentních obojživelníků plně nevzniká, ačkoli se hypobranchiale 4 ve vzácných případech objevuje rudimentárně u velemloka amerického (*Cryptobranchus alleganiensis*, dříve *Menopoma*) (Edgeworth, 1923).

V první polovině 20. století, poté co byly rozpracovány některé principy genetické reg-

ulace vývoje octomilky, ale o regulaci vývoje obratlovců se zatím nevědělo prakticky nic, přišel R. Goldschmidt (Goldschmidt, 1933), mimo jiné na základě poznatků o homeotických transformacích segmentů octomilky, s kontroverzním termínem nadějně monstrum (*hopeful monster*). Tento termín popisuje hypotetické situace v nichž by docházelo ke skokovým makroevolučním událostem v následku takzvaných makromutací, neboli mutací v jediném genu s významnou funkcí v embryonálním vývoji, která by vedla k odštěpení nové evoluční linie, jejímiž předky by byli vysoce abnormální jedinci, jejichž abnormální fenotyp v dané situaci odpovídal selekčním tlakům.

Výsledky této práce by mohly naznačovat, že změny v segmentaci faryngového aparátu na úrovni počtu vnějších žaber a počtu elementů hyobranchiálního skeletu, kterou pozorujeme v evoluci obojživelníků a příbuzných skupin, jsou následkem mutací v genech nebo dokonce v jediném genu, který hraje zásadní roli v regulaci metabolismu kyseliny retinové na úrovni koncentrace a načasování signalizace. Manipulace s touto jedinou signální dráhou přitom má za následek spuštění vývojového programu celého relativně komplexního orgánu. V takovém případě by se genový aparát kyseliny retinové mohl ukázat jako potenciální mechanismus, který by mohl produkovat nadějná monstra v Goldschmidtově smyslu. Spektrum fenotypů popsaných v této práci a fenotypů známých v rámci přirozené variability vnějších žaber a hyobranchiálního skeletu může ovšem poukazovat na změny velmi postupného charakteru, které nevyžadují převratné transformace na způsob nadějných monster.

5.5 Ve vývoji vnějších žaber funguje kyselina retinová ve dvou fázích

Ve výsledcích experimentů zdokumentovaných v této práci je patrný dvojitý efekt na vnější žábry axolotla. Jednak vzniká ektopická vnější žába, případně ektopický pár vnějších žaber, na čtvrtém branchiálním oblouku a jednak jsou všechny vnější žábry včetně těch, které vznikají normálně, defektní v tom smyslu, že jsou výrazně zkrácené a branchiální filamenty buď chybí, anebo vykazují značný defekt (Tabule 17). Tyto výsledky poukazují na to, že kyselina retinová je nutným faktorem určujícím zakládání branchiálních filamentů. Branchiální filamenty zároveň exprimují gen *Raldh2*, který kóduje enzym produkující kyselinu retinovou. *Raldh2* je zároveň exprimován v růstové špičce každé vnější žábry (Tabule 4) a také na dorsální straně každé vnější žábry (Tabule 2), což platí také pro indukované vnější žábry (Tabule 22). Zároveň je iniciace vnější žábry doprovázena expresí

Cyp26b, který naopak inaktivuje signalizaci kyseliny retinové, což je podpořeno tím, že aplikace inhibitorů RAR, která mimikuje aktivitu *Cyp26b*, vede k vyrůstání vnější žábry také na oblouku, v němž *Cyp26b* normálně není aktivní. Na základě těchto pozorování byl proveden experiment 9, při němž byla embrya axolotla vystavena vysoké koncentraci inhibitoru AGN194310 po dobu 4 dnů a následně byl inhibitor odstraněn. Na těchto embryích jsou viditelné žábry, u nichž se vyrůstání vnější žábry zastavilo, a žábry, u nichž byl proces vyrůstání po odstranění inhibitoru obnoven (Tabule 30). Je proto možné, že ve vývoji vnějších žaber existují dvě fáze. První fáze vyžaduje inhibici signalizace kyseliny retinové a druhá fáze naopak vyžaduje produkci kyseliny retinové. Inhibitory použité v této práci posilují a rozšiřují endogenní efekt inhibice kyseliny retinové do té míry, že aktivace receptorů kyseliny retinové není dostatečná pro to, aby došlo k inaktivaci latentního vývojového programu vnější žábry také na čtvrtém branchiálním oblouku. Druhá fáze vývoje vnější žábry je oproti tomu charakterizována produkcí kyseliny retinové. Aktivita kyseliny retinové se tak zdá být opačná než je tomu, přinejmenším na myším a rybím (*Danio rerio*) modelu, v případě končetin v nichž kyselina retinová také funguje ve dvou fázích, ale s tím rozdílem, že kyselina retinová je nezbytná pro iniciaci končetin a její aktivní odstraňování aktivitou *Cyp26b* je naopak nezbytné pro pokračující vyrůstání končetin (oddíl 1.2.4). Výsledky této práce by ale mohly poukazovat na to, že končetiny axolotla se neřídí stejnými principy jako končetiny myši a ploutve *Danio rerio*, neboť v některých případech vedla časově omezená inhibice receptorů naopak k hypertrofii základů končetin (Tabule 28), které také obsahují předčasně se vyvíjející chrupavky (Tabule 33, B). Vývoj končetin ale není cílem této práce a proto nebyl tento fenotyp blíže analyzován a kvantifikován.

6 Závěr

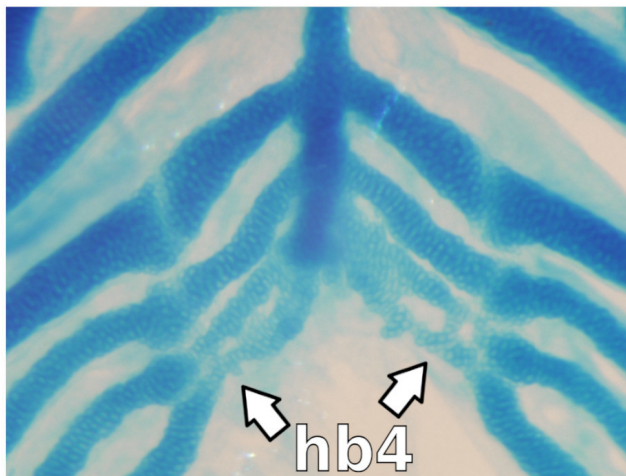
Z výsledků této práce vyplývá, že kyselina retinová má zásadní určující vliv na morfologii faryngeálních segmentů axolotla. Syntetické inhibitory receptorů kyseliny retinové vyvolávají u axolotla změny v počtu vnějších žaber a v počtu chrupavčitých elementů hypobranchiálního skeletu. Inhibice receptorů kyseliny retinové vyvolává vznik vnější žábry na čtvrtém branchiálním oblouku, který normálně žábry nenesí a zároveň vede ke vzniku skeletálních elementů hypobranchiale 3, hypobranchiale 4 a ceratobranchiale 5.

V literatuře bylo popsáno několik typů variability faryngeálního aparátu obojživelníků: a) mezidruhová variabilita v počtu hypobranchiálí jako fylogenetický znak (Hyno-

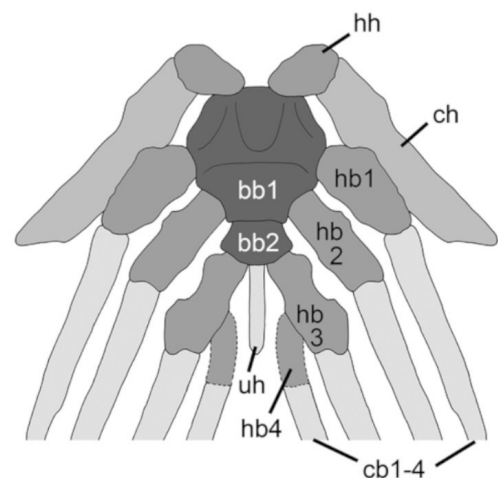
biidae), který může být zároveň doprovázen čtvrtou žábrou (*Ranodon*); b) vnitrodruhová variabilita v počtu hypobranchiálí (*Notophtalmus*, *Salamadra*, *Cryptobranchus*); c) mezidruhová variabilita v počtu ceratobranchiálí, která může zároveň být během evoluce reversibilní (*Desmognathus*); d) vnitrodruhová variabilita v počtu ceratobranchiálí (*Hemidactylum*). Pro všechny tyto jevy se nabízí na základě výsledků této práce kyselina retinová jako možná příčina.

Celkově se pozorované fenotypy dají popsat jako homeotické transformace posteriorních branchiálních oblouků na anteriorní. Pokud lze zobecnit výsledky této práce na všechny obratlovce, tak se jedná o první evidenci o určujícím vlivu kyseliny retinové na identitu faryngeálních a zvláště branchiálních oblouků. Je možné, že kyselina retinová má podobný vliv na vývoj faryngeálních segmentů v ontogenezi a evoluci obratlovců obecně.

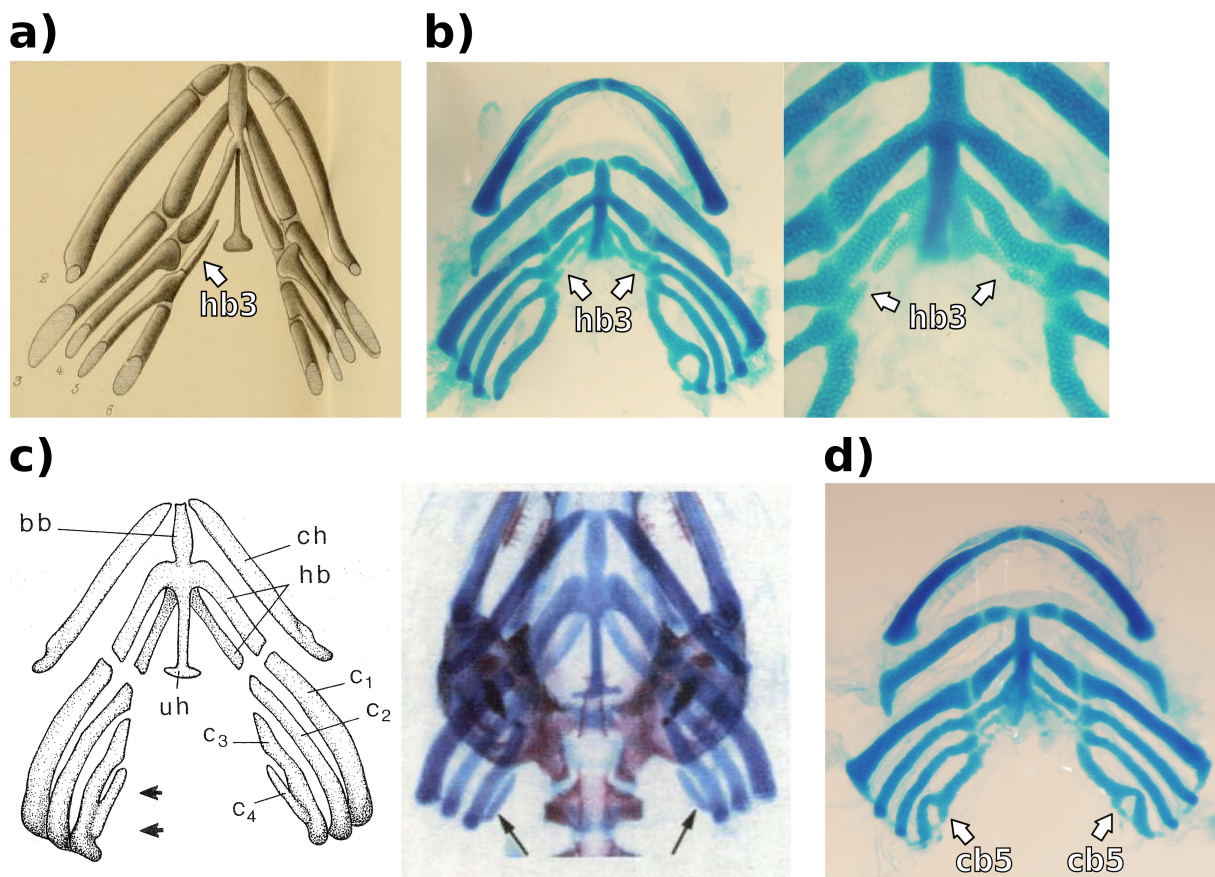
Axolotl



Tiktaalik



Obrázek 8: Srovnání skeletu axolotla s indukovanými elementy hypobranchiale 3 (hb3) a hypobranchiale 4 (hb4) s hypobranchiálním skeletem tiktaalika (*Tiktaalik rosae*). Upraveno podle Witzmann (2013)



Obrázek 9: a) - Kresba hyobranchiálního skeletu larvy mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*, v původní publikaci *Salamandra maculata*). Upraveno podle (Kallius, 1901). hb3 - hypobranchiale 3. Kosterní element hypobranchiale 3 se ve skeletu larev tohoto druhu a obecně salamandroidní linie ocasatých obvykle nevyskytuje. I v tomto případě je hb3 pouze unilaterální a plně se nenapojuje na basibranchiale. b) - Velmi podobná situace vyvolaná experimentálně inhibicí receptorů kyseliny retinové (BMS493) u larev axolotla. Na levé straně je hypobranchiale 3 tvořeno dvěma proti sobě vyrůstajícími elementy, které plně nesrůstají, jedna část vyrůstá z ceratobranchiale 3 a druhá z basibranchiale. Na pravé straně je hb3 srostlé úplně. Je možné, že u některých jedinců mloka skvrnitého dochází ke vzniku těchto ektopických elementů, je-li narušena rovnováha v signalizaci kyseliny retinové, možná následkem deficiencie vitamínu A. c) - Hyobranchiální skelet larev druhu *Hemidactylium scutatum* z čeledi Plethodontidae podle Rose (1995) a Rose (2003), jejichž charakteristickým znakem je redukce počtu ceratobranchiálií na tři. U některých jedinců *H. scutatum* se ale vyskytuje rudimentální ceratobranchiale 4 (c4). Šipky ukazují rudimentální ceratobranchiale 4. d) - Struktura na ceratobranchiale 4, která s vysokou frekvencí vzniká po inhibici RAR u axolotla. Tuto strukturu je možné pokládat za ceratobranchiale 5, a tudíž za posteriorní extenzi faryngeálního aparátu.

Seznam literatury

- Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J. M., Taketo, M. M., Nakamura, T., Behringer, R. R., et al. (2004). Interactions between sox9 and β -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes & development*, 18(9):1072–1087.
- Baltzinger, M., Ori, M., Pasqualetti, M., Nardi, I., & Rijli, F. M. (2005). Hoxa2 knock-down in xenopus results in hyoid to mandibular homeosis. *Developmental Dynamics*, 234(4):858–867.
- Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25):6506–6511.
- Barske, L., Fabian, P., Hirschberger, C., Jandzik, D., Square, T., Xu, P., Nelson, N., Yu, H. V., Medeiros, D. M., Gillis, J. A., & Crump, J. G. (2020). Evolution of vertebrate gill covers via shifts in an ancient pou3f3 enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(40):24876–24884.
- Bateson, W., Clay, C. J., & Pierpont, F. H. (1894). *Materials for the study of variation treated with especial regard to discontinuity in the origin of species*. London, Macmillan.
- Bayha, E., Jørgensen, M. C., Serup, P., & Grapin-Botton, A. (2009). Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis. *PLOS ONE*, 4(6):1–15.
- Begemann, G., Schilling, T. F., Rauch, G.-J., Geisler, R., & Ingham, P. W. (2001). The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development*, 128(16):3081–3094.
- Bordzilovskaya, N., Dettlaff, T., Duhon, S. T., & Malacinski, G. M. (1989). Developmental-stage series of axolotl embryos. *Developmental biology of the axolotl*, 201:219.
- Boy, J. A. (1974). Die larven der rhachitomen amphibien (amphibia: Temnospondyli; karbon—trias) the larvae of rhachitomous amphibia (amphibia: Temnospondyli; carboniferous—triassic) mit 14 abbildungen und 1 tabelle im text. *Paläontologische Zeitschrift*, 48:236–268.

- Britz, R. & Johnson, G. D. (2003). On the homology of the posteriormost gill arch in polypterids (cladistia, actinopterygii). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 138(4):495–503.
- Brothers, A. (1977). Instructions for the care and feeding of axolotls. *Axolotl Newsletter*, 3:9–16.
- Cañestro, C., Postlethwait, J. H., González-Duarte, R., & Albalat, R. (2006). Is retinoic acid genetic machinery a chordate innovation? *Evolution & development*, 8(5):394–406.
- Chazaud, C., Chambon, P., & Dollé, P. (1999). Retinoic acid is required in the mouse embryo for left-right asymmetry determination and heart morphogenesis. *Development*, 126(12):2589–2596.
- Chen, Y., Pollet, N., Niehrs, C., & Pieler, T. (2001). Increased *xraldh2* activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of xenopus embryos. *Mechanisms of development*, 101(1-2):91–103.
- Cox, D. C. & Tanner, W. W. (1989). Hyobranchial apparatus of the cryptobranchioidea (amphibia). *The Great Basin Naturalist*, pages 482–490.
- Cunningham, T. J. & Duester, G. (2015). Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(2):110–123.
- Davidian, A. & Malashichev, Y. (2013). Dual embryonic origin of the hyobranchial apparatus in the mexican axolotl (*ambystoma mexicanum*). *Int. J. Dev. Biol*, 57(11/12).
- Delaurier, A. (2018). Evolution and development of the fish jaw skeleton. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 8.
- Don, E., de Jong-Curtain, T., Doggett, K., Hall, T., Heng, B., Badrock, A., Winnick, C., Nicholson, G., Guillemin, G., Currie, P., Hesselson, D., Heath, J., & Cole, N. (2016). Genetic basis of hindlimb loss in a naturally occurring vertebrate model. *Biology Open*, 5.
- Downs, J. P., Daeschler, E. B., Jenkins, F. A., & Shubin, N. H. (2008). The cranial endoskeleton of *tiktaalik roseae*. *Nature*, 455(7215):925–929.

- Duboule, D. (1994). Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Development*, 1994(Supplement):135–142.
- Duboule, D. (2007). The rise and fall of Hox gene clusters. *Development*, 134(14):2549–2560.
- Edgeworth, F. (1923). On the larval hyobranchial skeleton and musculature of cryptobranchus, menopoma, and ellipsoglossa. *Journal of Anatomy*, 57(Pt 2):97.
- Elwood, J. R. L. & Cundall, D. (1994). Morphology and behavior of the feeding apparatus in cryptobranchus alleganiensis (amphibia: Caudata). *Journal of Morphology*, 220(1):47–70.
- Ericsson, R. & Olsson, L. (2004). Patterns of spatial and temporal visceral arch muscle development in the mexican axolotl (ambystoma mexicanum). *Journal of Morphology*, 261(2):131–140.
- Escriva, H., Holland, N. D., Gronemeyer, H., Laudet, V., & Holland, L. Z. (2002). The retinoic acid signaling pathway regulates anterior/posterior patterning in the nerve cord and pharynx of amphioxus, a chordate lacking neural crest. *Development*, 129(12):2905–2916.
- Favier, B. & Dollé, P. (1997). Development functions of mammalian hox genes. *Molecular human reproduction*, 3:115–31.
- Fox, H. (1959). A study of the development of the head and pharynx of the larval urodele hynobius and its bearing on the evolution of the vertebrate head. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 242(690):151–204.
- Gao, K.-Q. & Shubin, N. H. (2003). Earliest known crown-group salamanders. *Nature*, 422(6930):424–428.
- Gao, K.-Q. & Shubin, N. H. (2012). Late jurassic salamandroid from western liaoning, china. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(15):5767–5772.
- Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M., & Gridley, T. (1993). Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell*, 75(7):1317–1331.

- Gibert, Y., Bernard, L., Debiais-Thibaud, M., Bourrat, F., Joly, J.-S., Pottin, K., Meyer, A., Retaux, S., Stock, D. W., Jackman, W. R., et al. (2010). Formation of oral and pharyngeal dentition in teleosts depends on differential recruitment of retinoic acid signaling. *The FASEB Journal*, 24(9):3298.
- Gibert, Y., Gajewski, A., Meyer, A., & Begemann, G. (2006). Induction and prepatterning of the zebrafish pectoral fin bud requires axial retinoic acid signaling.
- Gillis, A., Fritzenwanker, J., & Lowe, C. (2011). A stem-deuterostome origin of the vertebrate pharyngeal transcriptional network. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 279:237–46.
- Glasauer, S. M. & Neuhauss, S. C. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular genetics and genomics*, 289:1045–1060.
- Glover, J. C., Renaud, J.-S., & Rijli, F. M. (2006). Retinoic acid and hindbrain patterning. *Journal of Neurobiology*, 66(7):705–725.
- Goldschmidt, R. (1933). Some aspects of evolution. *Science*, 78(2033):539–547.
- Graham, A. (2008). Deconstructing the pharyngeal metamere. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 310B(4):336–344.
- Graham, A., Butts, T., Lumsden, A., & Kiecker, C. (2014). What can vertebrates tell us about segmentation? *EvoDevo*, 5:24.
- Graham, A., Heyman, I., & Lumsden, A. (1993). Even-numbered rhombomeres control the apoptotic elimination of neural crest cells from odd-numbered rhombomeres in the chick hindbrain. *Development*, 119(1):233–245.
- Graham, A. & Richardson, J. (2012). Developmental and evolutionary origins of the pharyngeal apparatus. *Evodevo*, 3(1):1–8.
- Graham, A. & Smith, A. (2001). Patterning the pharyngeal arches. *Bioessays*, 23(1):54–61.
- Grandel, H. & Brand, M. (2011). Zebrafish limb development is triggered by a retinoic acid signal during gastrulation. *Developmental dynamics*, 240(5):1116–1126.

- Grandel, H., Lun, K., Rauch, G.-J., Rhinn, M., Piotrowski, T., Houart, C., Sordino, P., Kuchler, A. M., Schulte-Merker, S., Geisler, R., Holder, N., Wilson, S. W., & Brand, M. (2002). Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development*, 129(12):2851–2865.
- Griffin, K. J. P., Fekete, D. M., & Carlson, B. M. (1987). A monoclonal antibody stains myogenic cells in regenerating newt muscle. *Development*, 101(2):267–277.
- Guthrie, S., Muchamore, I., Kuroiwa, A., Marshall, H., Krumlauf, R., & Lumsden, A. (1992). Neuroectodermal autonomy of *hox-2.9* expression revealed by rhombomere transpositions. *Nature*, 356(6365):157–159.
- Hammond, L., Van Krinks, C., Durham, J., Tomkins, S., Burnett, R., Jones, E., Chandraratna, R., & Brown, G. (2001). Antagonists of retinoic acid receptors (rars) are potent growth inhibitors of prostate carcinoma cells. *British journal of cancer*, 85(3):453–462.
- Han, J., Morris, S., Ou, Q., Shu, D., & Huang, H. (2017). Meiofaunal deuterostomes from the basal Cambrian of Shaanxi (China). *Nature*, 542:228–.
- Hannibal, R. L. & Patel, N. H. (2013). What is a segment? *EvoDevo*, 4:1–10.
- Hauswirth, G. M., Garside, V. C., Wong, L. S., Bildsoe, H., Manent, J., Chang, Y.-C., Nefzger, C. M., Firas, J., Chen, J., Rossello, F. J., et al. (2022). Breaking constraint of mammalian axial formulae. *Nature Communications*, 13(1):243.
- Hunter, M. P. & Prince, V. E. (2002). Zebrafish *hox* paralogue group 2 genes function redundantly as selector genes to pattern the second pharyngeal arch. *Developmental Biology*, 247(2):367–389.
- Jandzik, D., Garnett, A. T., Square, T. A., Cattell, M. V., Yu, J.-K., & Medeiros, D. M. (2015). Evolution of the new vertebrate head by co-option of an ancient chordate skeletal tissue. *Nature*, 518(7540):534–537.
- Janvier, P. & Arsénault, M. (2007). The anatomy of *Euphanerops longaevus* Woodward, 1900, an anaspid-like jawless vertebrate from the upper Devonian of Miguasha, Quebec, Canada. *Geodiversitas*, 29:143–216.

- Jefferies, R. P. S., Brown, N. A., & Daley, P. E. J. (1996). The early phylogeny of chordates and echinoderms and the origin of chordate left–right asymmetry and bilateral symmetry. *Acta Zoologica*, 77(2):101–122.
- Kallius, E. (1901). *Anatomische Hefte 1. Abt Arbeiten aus anatomischen Instituten*, volume Bd. 16 (1901). München, J.F. Bergmann,.
- Kapli, P., Natsidis, P., Leite, D. J., Fursman, M., Jeffrie, N., Rahman, I. A., Philippe, H., Copley, R. R., & Telford, M. J. (2021). Lack of support for deuterostomia prompts reinterpretation of the first bilateria. *Science advances*, 7(12):eabe2741.
- Kardong, K. (2009). *Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution*. McGraw-Hill Higher Education.
- Kelly Kuan, C.-Y., Tannahill, D., Cook, G. M., & Keynes, R. J. (2004). Somite polarity and segmental patterning of the peripheral nervous system. *Mechanisms of Development*, 121(9):1055–1068. The Chick in Developmental Biology.
- Kerney, R., Blackburn, D., Müller, H., & Hanken, J. (2012). Do larval traits re-evolve? evidence from the embryogenesis of a direct-developing salamander, plethodon cinereus. *Evolution; international journal of organic evolution*, 66:252–62.
- Kerr, J. G. (1900). The external features in the development of lepidosiren paradoxa, fitz. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 192:299–330.
- Kessel, M. (1992). Respecification of vertebral identities by retinoic acid. *Development*, 115 2:487–501.
- Keynes, R. & Stern, C. (1984). Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature*, 310(5980):786—789.
- Kintner, C. R. & Brockes, J. P. (1984). Monoclonal antibodies identify blastemal cells derived from dedifferentiating muscle in newt limb regeneration. *Nature*, 308(5954):67–69.
- Kintner, C. R. & Brockes, J. P. (1985). Monoclonal antibodies to the cells of a regenerating limb. *Development*, 89(1):37–55.

- Kopinke, D., Sasine, J., Swift, J., Stephens, W. Z., & Piotrowski, T. (2006). Retinoic acid is required for endodermal pouch morphogenesis and not for pharyngeal endoderm specification. *Developmental Dynamics*, 235(10):2695–2709.
- Krumlauf, R. & Wilkinson, D. G. (2021). Segmentation and patterning of the vertebrate hindbrain. *Development*, 148(15):dev186460.
- Langston, A. W. & Gudas, L. J. (1994). Retinoic acid and homeobox gene regulation. *Current Opinion in Genetics Development*, 4(4):550–555.
- Lawrence, P. A. & Morata, G. (1994). Homeobox genes: their function in drosophila segmentation and pattern formation. *Cell*, 78(2):181–189.
- Le Pabic, P., Scemama, J.-L., & Stellwag, E. J. (2010). Role of hox pg2 genes in nile tilapia pharyngeal arch specification: implications for gnathostome pharyngeal arch evolution. *Evolution & Development*, 12(1):45–60.
- Li, P., Ross, C. F., & Luo, Z.-X. (2022). Morphological disparity and evolutionary transformations in the primate hyoid apparatus. *Journal of Human Evolution*, 162:103094.
- Liu, Y., Carlisle, E. M., Zhang, H., Yang, B., Steiner, M., Shao, T., Duan, B., Marone, F., Xiao, S., & Donoghue, P. C. J. (2022). Saccorhynchus is an early ecdysozoan and not the earliest deuterostome. *Nature*, 609:541 – 546.
- Maden, M. (1993). The homeotic transformation of tails into limbs in rana temporaria by retinoids. *Developmental Biology*, 159(2):379–391.
- Minoux, M., Antonarakis, G. S., Kmita, M., Duboule, D., & Rijli, F. M. (2009). Rostral and caudal pharyngeal arches share a common neural crest ground pattern. *Development*, 136(4):637–645.
- Minoux, M. & Rijli, F. M. (2010). Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development*, 137(16):2605–2621.
- Mohanty-Hejmadi, P., Dutta, S. K., & Mahapatra, P. (1992). Limbs generated at site of tail amputation in marbled balloon frog after vitamin a treatment. *Nature*, 355(6358):352–353.

- Monaghan, J. R. & Maden, M. (2012). Visualization of retinoic acid signaling in transgenic axolotls during limb development and regeneration. *Developmental biology*, 368(1):63–75.
- Montandon, S. A., Fofonjka, A., & Milinkovitch, M. C. (2019). Elastic instability during branchial ectoderm development causes folding of the *Chlamydosaurus* erectile frill. *eLife*, 8:e44455.
- Morioka, S., Mohanty-Hejmadi, P., Yaoita, Y., & Tazawa, I. (2018). Homeotic transformation of tails into limbs in anurans. *Development, Growth & Differentiation*, 60(6):365–376.
- Newcomer, M. E., Pappas, R. S., & Ong, D. E. (1993). X-ray crystallographic identification of a protein-binding site for both all-trans-and 9-cis-retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19):9223–9227.
- Niederreither, K. & Dollé, P. (2008). Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nature reviews. Genetics*, 9(7):541—553.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., & Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature genetics*, 21(4):444—448.
- Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P., & Dollé, P. (2002). Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse.
- Noden, D. M. & Trainor, P. A. (2005). Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *Journal of Anatomy*, 207(5):575–601.
- Nolte, C., De Kumar, B., & Krumlauf, R. (2019). Hox genes: Downstream “effectors” of retinoic acid signaling in vertebrate embryogenesis. *genesis*, 57(7-8):e23306.
- Okaajima, K. (1922). Zur anatomie des hyobranchialskeletes bei den onychodactyluslarven. *Folia Anatomica Japonica*, 1(4):195–200.
- Poopalasundaram, S., Richardson, J., Scott, A., Donovan, A., Liu, K., & Graham, A. (2019). Diminution of pharyngeal segmentation and the evolution of the amniotes. *Zoological Letters*, 5(1). Cited by: 11; All Open Access, Gold Open Access, Green Open Access.

- Pourquié, O. (2022). A brief history of the segmentation clock. *Developmental Biology*, 485:24–36.
- Pushel, I., Trainor, P. A., & Krumlauf, R. (2021). Specification of axial identity by *hoxa2* distinguishes between a phenotypic and molecular ground state in mouse cranial neural crest cells. *bioRxiv*, pages 2021–02.
- Reijntjes, S., Blentic, A., Gale, E., & Maden, M. (2005). The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Developmental biology*, 285(1):224–237.
- Richardson, J., Shono, T., Okabe, M., & Graham, A. (2012). The presence of an embryonic opercular flap in amniotes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1727):224–229.
- Rijli, F. M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dollé, P., & Chambon, P. (1993). A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell*, 75(7):1333–1349.
- Rose, C. (1995). Intraspecific variation in ceratobranchial number in hemidactylium scutatum (amphibia: Plethodontidae): Developmental and systematic implications. *Copeia*, 1995:228–232.
- Rose, C. (2003). *The Developmental Morphology of Salamanders Skulls (With Figure Abbreviations)*, pages 1686–1783.
- Rose, C. (2009). Generating, growing and transforming skeletal shape: insights from amphibian pharyngeal arch cartilages. *BioEssays*, 31(3):287–299.
- Rose, C. (2014). The importance of cartilage to amphibian development and evolution. *The International journal of developmental biology*, 58:917–927.
- Roček, Z. (2003). *Larval Development and Evolutionary Origin of the Anuran Skull*, pages 1877–1995.
- Russo, J. E., Hauquitz, D., & Hilton, J. (1988). Inhibition of mouse cytosolic aldehyde dehydrogenase by 4-(diethylamino) benzaldehyde. *Biochemical pharmacology*, 37(8):1639–1642.

- Schoch, R. R. & Witzmann, F. (2011). Bystrow's paradox – gills, fossils, and the fish-to-tetrapod transition. *Acta Zoologica*, 92(3):251–265.
- Schoch, R. R. & Witzmann, F. (2024). The evolution of larvae in temnospondyls and the stepwise origin of amphibian metamorphosis. *Biological Reviews*.
- Schubert, M., Yu, J.-K., Holland, N. D., Escriva, H., Laudet, V., & Holland, L. Z. (2005). Retinoic acid signaling acts via Hox1 to establish the posterior limit of the pharynx in the chordate amphioxus. *Development*, 132(1):61–73.
- Schwarz, D., Heiss, E., Pierson, T. W., Konow, N., & Schoch, R. R. (2023). Using salamanders as model taxa to understand vertebrate feeding constraints during the late devonian water-to-land transition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 378(1891):20220541.
- Sefton, E. M., Piekarski, N., & Hanken, J. (2015). Dual embryonic origin and patterning of the pharyngeal skeleton in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Evolution & Development*, 17(3):175–184.
- Serittrakul, P., Éric Samarut, Lama, T. T., Gibert, Y., Laudet, V., & Jackman, W. R. (2012). Retinoic acid expands the evolutionarily reduced dentition of zebrafish. *The FASEB Journal*, 26:5014 – 5024.
- Shmalgauzen, I. I., T. K. S. (1968). *The origin of terrestrial vertebrates*. Academic Press,, New York,.
- Shone, V., Oulion, S., Casane, D., Laurenti, P., & Graham, A. (2016). Mode of reduction in the number of pharyngeal segments within the sarcopterygians. *Zoological Letters*, 2.
- Simakov, O., Kawashima, T., Marlétaz, F., Jenkins, J., Koyanagi, R., Mitros, T., Hisata, K., Bredeson, J., Shoguchi, E., Gyoja, F., et al. (2015). Hemichordate genomes and deuterostome origins. *Nature*, 527(7579):459–465.
- Sleight, V. A. & Gillis, J. A. (2020). Embryonic origin and serial homology of gill arches and paired fins in the skate, *leucoraja erinacea*. *Elife*, 9:e60635.
- Smith, A. (2005). The pre-radial history of echinoderms. *Geological Journal*, 40:255 – 280.

- Smith, S. C. & Armstrong, J. B. (1990). Whole-mount immunocytochemistry in axolotl embryos. *Axolotl Newsletter*, 19:28–30.
- Stundl, J., Pospisilova, A., Jandzik, D., Fabian, P., Dobiasova, B., Minarik, M., Metscher, B., Soukup, V., & Cerny, R. (2019). Bichir external gills arise via heterochronic shift that accelerates hyoid arch development. *eLife Sciences*.
- Tanaka, K., Shiina, T., Tomita, T., Suzuki, S., Hosomichi, K., Sano, K., Kono, A., Komiyama, T., Inoko, H., Kulski, J. K., et al. (2013). Evolutionary relations of hexanchiformes deep-sea sharks elucidated by whole mitochondrial genome sequences. *BioMed research international*, 2013.
- Taneja, R., Bouillet, P., Boylan, J. F., Gaub, M.-P., RoY, B., Gudas, L. J., & Chambon, P. (1995). Reexpression of retinoic acid receptor (rar) gamma or overexpression of rar alpha or rar beta in rar gamma-null f9 cells reveals a partial functional redundancy between the three rar types. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17):7854–7858.
- Tarazona, O. A., Slota, L. A., Lopez, D. H., Zhang, G., & Cohn, M. J. (2016). The genetic program for cartilage development has deep homology within bilateria. *Nature*, 533(7601):86–89.
- van der Wees, J., Schilthuis, J. G., Koster, C. H., Diesveld-Schipper, H., Folkers, G. E., Saag, P. T. v. d., Dawson, M. I., Shudo, K., Burg, B. v. d., & Durston, A. J. (1998). Inhibition of retinoic acid receptor-mediated signalling alters positional identity in the developing hindbrain. *Development*, 125(3):545–556.
- Veitch, E., Begbie, J., Schilling, T., Meredith Smith, M., & Graham, A. (1999). Pharyngeal arch patterning in the absence of neural crest. *Current Biology*, 9:1481–1484.
- Waskiewicz, A. J., Rikhof, H. A., & Moens, C. B. (2002). Eliminating zebrafish pbx proteins reveals a hindbrain ground state. *Developmental cell*, 3(5):723–733.
- Wendling, O., Dennefeld, C., and, P. C., & Mark, M. (2000). Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. *Development*, 127(8):1553–1562.
- White, J. C., Highland, M., Kaiser, M., & Clagett-Dame, M. (2000). Vitamin a deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Developmental biology*, 220(2):263–284.

- Witzmann, F. (2013). Phylogenetic patterns of character evolution in the hyobranchial apparatus of early tetrapods. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 104(2):145–167.
- Witzmann, F. & Brainerd, E. (2017). Modeling the physiology of the aquatic temnospondyl archegosaurus decheni from the early permian of germany. *Fossil Record*, 20:105–127.
- Witzmann, F. & Schoch, R. R. (2013). Reconstruction of cranial and hyobranchial muscles in the triassic temnospondyl gerrothorax provides evidence for akinetic suction feeding. *Journal of Morphology*, 274(5):525–542.
- Witzmann, F. & Schoch, R. R. (2022). The larval brachyopid platycepsion wilkinsoni from the triassic of new south wales provides insight into the stereospondyl life cycle. *Journal of Paleontology*, 96(6):1447–1460.
- Yashiro, K., Zhao, X., Uehara, M., Yamashita, K., Nishijima, M., Nishino, J., Saijoh, Y., Sakai, Y., & Hamada, H. (2004). Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Developmental cell*, 6:411–22.
- Zhou, C.-F., Bhullar, B.-A., Neander, A., Martin, T., & Luo, Z.-X. (2019). New jurassic mammaliaform sheds light on early evolution of mammal-like hyoid bones. *Science*, 365:276–279.
- Ziermann, J. M. & Diogo, R. (2013). Cranial muscle development in the model organism ambystoma mexicanum: Implications for tetrapod and vertebrate comparative and evolutionary morphology and notes on ontogeny and phylogeny. *The Anatomical Record*, 296(7):1031–1048.
- Šimková, K., Naraine, R., Vintr, J., Soukup, V., & Šindelka, R. (2023). Rna localization during early development of the axolotl. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11:1260795.