

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Kateřina Šimková**

Indukce levo-pravé asymetrické genové exprese  
ve ventrálním uzlu vlivem proudění extracelulární tekutiny

Induction of left-right asymmetric gene expression  
by extracellular fluid flow in ventral node

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Markéta Vegrichtová

Praha, 2020

## **Prohlášení**

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

V Praze, 20.5.2020

---

Kateřina Šimková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Markétě Vegrichtové za odbornou pomoc a cenné rady při vypracování této bakalářské práce.

## Abstrakt

Vznik levo-pravé tělní asymetrie, která při gastrulaci určuje orientaci tělních orgánů, je v myším embryu indukován v mnohobuněčném útvaru na anteriorním konci primitivního pruhu nazývaném ventrální uzel. Buňky ventrálního uzlu mají na svém povrchu krátké rotující cílie, které generují proudění extracelulární tekutiny směrem vlevo a proudění následně indukuje asymetrickou genovou expresi. Hlavní signalizační událost narušující symetrický vývoj spočívá ve spuštění Nodal signalizační dráhy a spuštění asymetrické exprese jejího člena *Nodal*. Narušením těchto procesů dochází k otočení běžné asymetrické exprese v uzlu, která vyústí v zrcadlové otočení tělních orgánů, nazývané též *situs inversus*. Existují dva modely zabývající se možnostmi, jak je informace z levostranného proudění přenášena do buněk uzlu, kde dochází k asymetrické expresi příslušných genů. Mechanosenzitivní model je založen na existenci pohyblivých cílií, vytvářejících proud, a nepohyblivých cílií, které na proud reagují otevřením polycystinových vápníkových kanálů. Podle chemosenzitivního modelu dochází k sekreci specifických morfogenů, které jsou unášeny proudem, a vazbou na příslušné receptory spouští signalizaci v buňkách. Dosud nebylo prokázáno, který z těchto dvou modelů platí v myším uzlu, ale jednou z pravděpodobných možností je, že zde dochází ke kombinaci obou modelů.

**Klíčová slova:** levo-pravá asymetrie, uzel, cílie, Nodal signalizační dráha, situs inversus, polycystinový vápníkový kanál, morfogeny

## **Abstract**

Left-right asymmetry determines the orientation of visceral organs during gastrulation in the mouse embryo. The asymmetry originates in ventral node which is located on the anterior end of primitive streak. Cells of the ventral node possess motile nodal cilia. These cilia rotate and generate leftward flow of extra-embryonic fluid. The leftward flow initiates asymmetric expression of Nodal signalling pathways in nodal cells. Abnormal nodal flow and the interruption of asymmetric gene expression cause reversal arrangement of visceral organs, called *situs inversus*. The mechanosensing and chemosensing models are the main theories addressing the question of how the leftward nodal flow is sensed by nodal cilia. The mechanosensing model, also referred to as 'two cilia model', is based on two types of cilia, motile and immotile. Motile cilia generate nodal flow while immotile cilia act as mechanosensors with polycystin cation channels. According to the chemosensing model, morphogens are secreted and form gradient that induces asymmetric gene expression in the node. It is still unclear which model is the right one, but it is possible that the final model is combination of both.

**Key words:** left-right asymmetry, node, cilium, Nodal signalling pathway, situs inversus, polycystin cation channel, morphogen

## Seznam použitých zkratek

ActRIIA	Type IIA activin receptor
ActRIIB	Type IIB activin receptor
ALK4	Activine receptor-like kinase 4
CERL2	Cerberus-like2
DVL	Dishevelled
EGF-CFC	Epidermal growth factor–Cripto/FRL-1/Cryptic
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GDF-1	Growth/differentiation factor-1
HNF3 $\beta$	Hepatocyte nuclear factors $\beta$
<i>inv</i>	inversion of embryonic turning
<i>iv</i>	inversus viscerus
LEFTY1	Left-Right Determination Factor 1
LEFTY2	Left-Right Determination Factor 2
<i>lgl</i>	legless
LPM	lateral plate mesoderm
LRD	Left-right dynein gene
NKX2-5	NK2 homeobox 5
NODAL	Nodal Growth Differentiation Factor
NVP	nodal vesicular parcels
ODA	Outer dynein arm
PCP	planar cell polarity
PFP	prospective floorplate
PITX2	Pituitary homeobox 2
PRICKLE2	Prickle-like protein 2
RA	Retinoic acid
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
SHH	Sonic Hedgehog
TGF- $\beta$	Transforming growth factor
VANGL1	Vang-like protein 1
VANGL2	Vang-like protein 2
Wnt	wingless-related integration site

# Obsah

Úvod.....	1
1. Uzel .....	2
1.1. Uzel jako organizátor .....	2
1.2. Popis uzlu .....	2
1.3. Korunkové a jamkové buňky.....	3
1.4. Vývoj uzlu .....	4
2. Pohyblivé cíle.....	5
2.1. Struktura .....	5
2.2. Posteriovní naklonění cílů.....	7
2.3. Rotace.....	8
3. Proudění v uzlu.....	8
3.1. Vznik proudu.....	8
3.2. Pravostranné proudění.....	9
3.3. Vliv Inversinu na funkci cílů.....	9
4. Vnímání proudu cíliemi.....	10
4.1. Chemosenzitivní model .....	10
4.1.1. Morfogenový model .....	10
4.1.2. NVP .....	12
4.2. Mechanosenzitivní model.....	14
4.2.1. Model dvou cílů .....	14
4.2.1.1. Pohyblivé cíle .....	14
4.2.1.2. Nepohyblivé cíle.....	15
4.2.2. Polycystin-2.....	15
4.2.2.1. Funkce Polycystinu-2 .....	15
4.2.2.2. Polycystin-2 v cílech uzlu .....	16
5. Nodal signální dráha .....	17
5.1. NODAL.....	17
5.2. Regulace asymetrické genové exprese .....	18
5.3. Přesun proteinu NODAL z uzlu do LPM .....	19
5.4. Exprese genů v LPM .....	20
5.5. LEFTY.....	20
5.6. PITX2 .....	20
5.7. Nodal signální dráha a iv, inv mutanti .....	21
Závěr.....	22
Použitá literatura.....	24

# Úvod

Levo-pravá asymetrie určuje polohu orgánů těla obratlovců. Při správném vývoji se srdce, žaludek a slezina nacházejí na levé straně, zatímco játra jsou typicky umístěna na pravé straně. Tento stav, kdy jsou vnitřní orgány orientovány správným směrem, se označuje jako *situs solitus*. Pokud při ranné embryogenezi dojde k narušení procesu vzniku levo-pravé asymetrie, může dojít ke stavu nazývaném *situs inversus*, kdy jsou orgány uloženy zrcadlově obráceně ke své fyziologické pozici.

V této bakalářské práci jsem se zaměřila na procesy, které vedou ke vzniku levo-pravé asymetrické genové exprese určující levo-pravou asymetrii těla myši, jakožto savčího modelového organismu. Centrem pro tyto procesy je v myším embryu ventrální uzel, který se nachází na anteriorním konci primitivního pruhu. Ve ventrálním uzlu dochází vlivem rotujících uzlových cílů ke vzniku proudění extracelulární tekutiny. Tento proud dále indukuje asymetrickou expresi genu pro Uzlový růstový diferenciační faktor (NODAL, Nodal Growth Differentiation Factor) a spuštění Nodal signalizační dráhy.

Cílem literární rešerše je shrnout a porovnat nejdůležitější známé poznatky o dvou hlavních modelech, které se zabývají, jakým způsobem buňky uzlu vnímají informace z levostranného proudění. V první části této práce se budu zabývat popsáním struktury uzlu jakožto levo-pravého organizátoru. Dále popíšu stavbu uzlových cílů přítomných na buňkách uzlu, porovnáám je s pohyblivými a nepohyblivými (primárními) cíliemi a vysvětlím základní mechanismus jejich rotačního pohybu, který vede ke vzniku levostranného proudění extracelulární tekutiny. Druhá část práce je zaměřena na představení chemosenzitivního a mechanosenzitivního modelu a popsání Nodal signalizační dráhy, která je aktivována jedním z těchto dvou systémů. I když dosud nebylo objasněno, který z těchto dvou modelů platí v uzlu, četné výzkumy již odhalily některé procesy probíhající v uzlu včetně nejdůležitější signální kaskády. V této práci se proto pokusím tyto dva modely porovnat a určit, který z nich v uzlu působí.

Další výzkumy by měli vést k vyjasnění rozporů v obou modelech, včetně možnosti propojení obou systémů. Odhalení procesů vedoucích k asymetrické genové expresi by mohlo pomoci k lepšímu pochopení některých závažných chorob, jako je například Kartagenerův syndrom, jehož jedním z příznaků je i *situs inversus*.

# 1. Uzel

## 1.1. Uzel jako organizátor

Uzel je masa buněk nacházející se na myším embryu zodpovědná za tvorbu notochordu a určení levo-pravé tělní asymetrie při vývoji orgánů (Bellomo et al., 1996; Nonaka et al., 2002; Okada et al., 1999). Díky objevu Spemannova organizátoru u obojživelníků bývá uzel a odpovídající struktury u dalších živočišných druhů označován jako organizátor. Jejich společným rysem je indukce okolních buněk k migraci a morfogenezi, což vede k tvorbě orgánů a tkání při vývoji embrya. V mnoha ohledech jsou ale tyto dvě struktury odlišné.

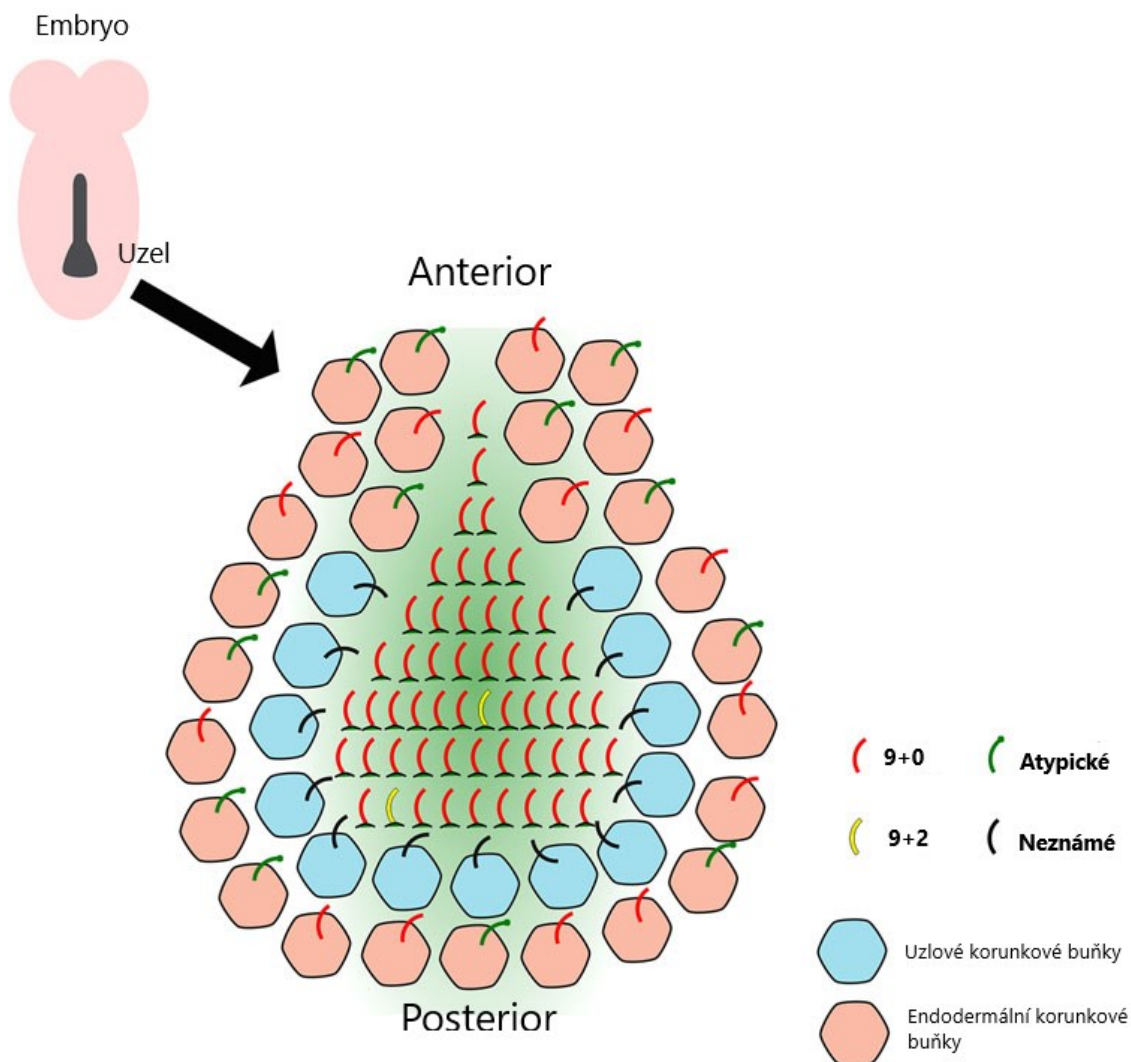
Hlavní funkcí Spemannova organizátoru, který se nachází na dorzálním rtu blastoporu, je indukce tvorby neurální tkáně a určení budoucí dorzoventrální a anterioposteriorní osy (Spemann and Mangold, 1924). U myši je ale vznik notochordu, indukčního centra pro vznik tělní osy, rozdělen i do oblastí mimo uzel – oblast anteriorního hlavového výběžku vzniká z progenitorů notochordu nezávisle na uzlu. Další části notochordu již vznikají jako deriváty uzlu – notochord trupu a notochord ocasu (Kinder et al., 2001; Yamanaka et al., 2007).

Uzel myši, modelového organismu pro savčí uzel, je navíc zodpovědný za vznik již zmíněné levo-pravé asymetrie (Nonaka et al., 2002; Okada et al., 1999), jenž u obojživelníků nevzniká činností Spemannova organizátoru, ale oblastí gastrocoelní střešní desky (Schweickert et al., 2007).

## 1.2. Popis uzlu

Uzel je u myši označení pro anteriorní konec primitivního pruhu distálního konce embrya a jeho vznik začíná v 7 dni vývoje (E7.0) (Bellomo et al., 1996; Sulik et al., 1994). Je konvexního tvaru a na povrchu embrya vytváří zřetelnou prohlubeň o šířce 50-60  $\mu\text{m}$ , délce 70-90  $\mu\text{m}$  (Lee and Anderson, 2008) a hloubce 50  $\mu\text{m}$  (Yamanaka et al., 2007), která je krytá Reichertovou membránou. Tato tenká bazální membrána je tvořena několika paralelními vrstvami a odděluje buňky embrya od trofoblastu. Vzniklá dutina je vyplněná extraembryonální tekutinou.

V uzlu se nachází asi 250 buněk (Lee and Anderson, 2008) o průměru 4-6  $\mu\text{m}$ , z jejichž povrchu vybíhá jedna cílie dlouhá 4-7  $\mu\text{m}$ . Buňky uzlu jsou obklopeny ektodermálními buňkami o velikosti 10-25  $\mu\text{m}$  (obrázek 1).



**Obrázek 1: Buňky uzlu.** Jamkové buňky uzlu s pohyblivými cíliemi se strukturou 9+0 jsou obklopeny uzlovými korunkovými buňkami a endodermálními korunkovými buňkami, jejichž cílie mohou mít jak 9+0, tak i 9+2 strukturu (převzato a upraveno podle Odate et al., 2016).

Uzel anteriorně přechází v hlavový výběžek, předchůdce notochordu. Buňky hlavového výběžku jsou svým tvarem a velikostí podobné uzlovým buňkám a také se na jejich povrchu nachází cílie. Cílie jsou kratší (2-5  $\mu\text{m}$ ) než cílie uzlu a anteriorním směrem jejich počet ubývá. Tyto buňky dále přecházejí ve vchlípeninu předního střeva, jenž obsahuje buňky s cíliemi jen zřídka (Bellomo et al., 1996).

### 1.3. Korunkové a jamkové buňky

Uzel je tvořen dvěma populacemi buněk, dorzální – vnitřní vrstvou a ventrální – vnější vrstvou. Tyto vrstvy jsou odděleny bazální membránou, která je přerušena pouze na konci primitivního pruhu. Dorzální ektodermální vrstva je na rozdíl od ventrální endodermální vrstvy

vysoce proliferativní. Ventrální vrstva sestává z prohlubně tvořené jamkovými buňkami a buněk, které jí ohraničují, tzv. korunkových buněk (obrázek 1). Jamkové buňky mají sloupcovitý tvar a malý apikální povrch, je pro ně charakteristická přítomnost jedné cílie na povrchu a předpokládá se, že slouží jako progenitor pro tvorbu notochordu a horní části trávicího traktu, čímž plní funkci organizátoru (Bellomo et al., 1996). Dále rotačním pohybem generují v uzlu levostranný proud, který spustí asymetrickou expresi genu *Nodal*. Nodal signalizační dráha poté zahajuje asymetrický vývoj tělních orgánů. (Collignon et al., 1996; Logan et al., 1998; Lowe et al., 1996; McGrath et al., 2003; Nonaka et al., 1998; Okada et al., 2005; Ryan et al., 1998).

Označení korunkové buňky bylo původně používáno, jak pro buňky sousedící s jamkovými buňkami (Yoshida et al., 2012), tak i pro buňky v okolí uzlu (Bellomo et al., 1996). Až s odhalením endodermálního původu buněk obklopujících uzlu, byly tyto dvě populace buněk rozlišeny a pojmenovány jako endodermální korunkové buňky a uzlové korunkové buňky. Obě populace buněk mají na svém povrchu krátké cílie, které jsou na rozdíl od cílů jamkových buněk většinou nepohyblivé. Endodermální korunkové buňky sousedí s okolním endodermem a vytvářejí horní stěnu uzlu. Uzlové korunkové buňky se nacházejí přímo v uzlové jamce a pravděpodobně se podílejí na vnímání proudu (Odate et al., 2016).

#### **1.4. Vývoj uzlu**

Buňky uzlu se začínají formovat v době vzniku alantoidního pupenu a přetrvávají až do fáze 7-8 somitů (Yamanaka et al., 2007). Přítomnost buněk uzlu před vznikem alantoidního pupenu nebyla prokázána, pokud se zde nacházejí, jsou kryté vrstvou primitivního endodermu. Na konci stádia tvorby alantoidního pupenu jsou v uzlu již zřetelné oblasti jamkových a korunkových buněk, ale prohlubeň tvořená jamkovými buňkami se vytváří až v časném stádiu hlavového výrůstku (Bellomo et al., 1996). Krátce po formaci uzlu se začínají na povrchu buněk vyvíjet cílie (Okada et al., 1999). Vzhledem k přítomnosti cílů se předpokládá, že tyto buňky pocházejí původem z epiblastu, protože extraembryonální endoderm nemá na svém povrchu cílie. První výskyt primárních cílů na epiblastu je v E6.0. V E8.0 jsou cílie přítomny na všech jeho derivátech, včetně cílů uzlu (Bangs et al., 2015).

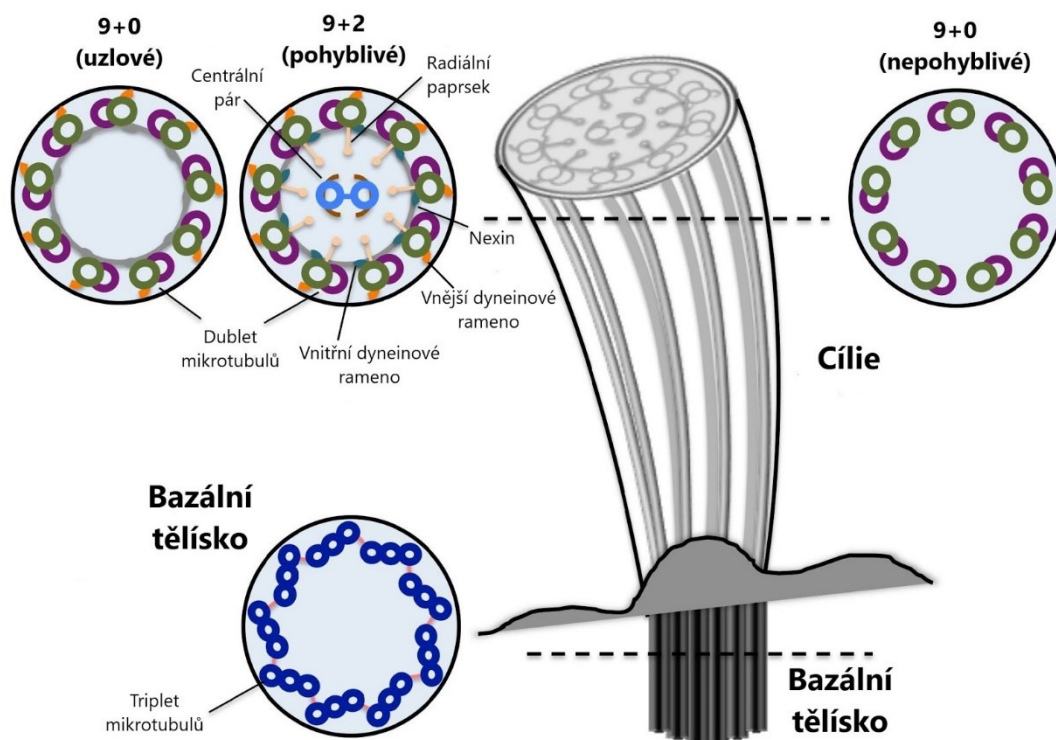
Růst cílů v uzlu je složen z 6 fází. Ve fázi 1 jsou cílie nepohyblivé. Ve fázi 2 dochází k prvním pohybům. Ve fázi 3 vznikají víry kolem jednotlivých cílů, které se ve fázi 4 spojují v jeden větší. Proud vzniká v 5. fázi, nicméně finální plynulý proud považujeme za fázi 6 (Okada et al., 1999).

## 2. Pohyblivé cílie

### 2.1. Struktura

Cílie se nacházejí na povrchu většiny buněk savčího těla a rozlišují se na dva základní typy – pohyblivé a nepohyblivé cílie. Nejčastěji se vyskytující nepohyblivé cílie mají senzorickou funkci. Pohyblivé cílie jsou přítomny jen na specializovaných buňkách, jako jsou například buňky respiračního epitelu, kde umožňují pohyb mukusu (shrnutí v Marshall and Nonaka, 2006). Zvláštní skupinou jsou krátké pohyblivé cílie vyskytující se pouze na buňkách ventrálního uzlu (Nonaka et al., 1998; Sulik et al., 1994), jejichž délka v rané fázi vývoje je průměrně 1,5  $\mu\text{m}$  a postupně se během vývoje embrya může i zdvojnásobit. (Bonnafe et al., 2004).

Základem struktury cílí jsou svazky mikrotubulů zvaných axonemy, které spojují cíli s tělem buňky prostřednictvím bazálního tělíska. Bazální tělísko je tvořeno 9 tripletů mikrotubulů rozlišovaných podle struktury na A-, B- a C-mikrotubuly, jenž jsou základem pro vznik A- a B- mikrotubul axonemy. B-mikrotubul axonemy přiléhá k A-mikrotubulu a spojují se v dublety. Nexin propojuje 9 těchto dubletů v kruh v periferní části axonemy (obrázek 2) (Afzelius, 1959; Gibbons and Grimstone, 1960).



**Obrázek 2: Typy cílí.** Uzlové cílie s 9+0 strukturou mikrotubulů. Pohyblivé cílie s 9 + 2 a nepohyblivé s 9 + 0 uspořádáním. Průřez bazálním tělískem ukazuje tripletové uspořádání mikrotubulů (převzato a upraveno podle Praveen et al., 2015).

Pohyblivé a nepohyblivé cílie se liší přítomností centrálního páru mikrotubulů. Nepohyblivé cílie tento centrální pár postrádají (9+0 struktura) (Barnes, 1961; Sorokin, 1962), zatímco pro pohyblivé cílie je přítomnost centrálního páru typická (9+2) (Afzelius, 1959; Gibbons and Grimstone, 1960).

Výjimku tvoří cílie jamkových buněk uzlu, které sice jsou pohyblivé, ale centrální pár ve většině cílích chybí (Bellomo et al., 1996; Casparly et al., 2007). Při zkoumání 315 cílích uzlu byly centrální mikrotubuly zaznamenány pouze u 7 z nich. Rozmístění těchto cílích v uzlu bylo čistě náhodné a nejsou známy rozdíly v jejich funkci.

Specifickou strukturu cílích lze nalézt u endodermálních korunkových buněk, které ohraničují uzlu. Tyto cílie postrádají centrální pár mikrotubulů (9+0 struktura), tak jako cílie jamkových buněk (obrázek 1), ale je zajímavé, že u poloviny buněk se vyskytují nekompletní páry periferních mikrotubulů s chybějícím nebo nekompletním B-mikrotubulem. (Odate et al., 2016). Chybějící B-mikrotubul může vysvětlovat nepohyblivost cílích, nebo jinou dosud nepoznanou funkci endodermálních korunkových buněk.

Pro pohyblivé cílie je charakteristické, že obsahují radiální paprsek, který spojuje vnější dublety s centrálními mikrotubuly navázáním se na A-mikrotubul a svojí aktivitou napomáhá pohybu cílích (Afzelius, 1959). Přestože radiální paprsek v cílích uzlu chybí, jsou schopny pohybu. Narozdíl od planárního pohybu pohyblivých cílích, cílie uzlu rotují, což je umožněno právě nepřítomností radiálního paprsku (Shinohara et al., 2015).

Pohyb cílích zajišťují proteiny známé jako molekulové motory, které se pohybují po vláknech cytoskeletu. Příkladem jsou dyneiny, které se pohybují podél mikrotubulů směrem k mínus konci vlákna, a kromě generování pohybu cílích jsou také schopné převážet uvnitř buňky váčky s nákladem. Běžně se u pohyblivých cílích dynein vyskytuje jako vnější (ODA, Outer dynein arm) a vnitřní rameno (Afzelius, 1959; Gibbons, 1963; Gibbons and Rowe, 1965), ale uzlové cílie vnitřní rameno pravděpodobně postrádají (Shinohara et al., 2015). Za rotační pohyb cílích je tedy zodpovědné ODA připojené k A-mikrotubulu, které za štěpení ATP interaguje s B-mikrotubulem a umožní klouzavý pohyb sousedících dubletů, deformaci axonemy a následný rotační pohyb cílích (Nicastro et al., 2006; Shinohara et al., 2015; Summers and Gibbons, 1971; Takada and Kamiya, 1994).

Dále k molekulovým motorům patří Proteiny z kinesinové rodiny (KIF, kinesin superfamily protein), které přenášejí náklad po vláknech mikrotubulů směrem k jejich plus konci (Vale et al., 1985b, 1985a). Kinesiny jsou také důležité pro správnou skladbu cílích. Pro vývoj cílích je podstatný protein KIF3A, v jehož nepřítomnosti nejsou cílie schopné vzniknout. U mutantů pro tento gen vznikají mnohé vývojové vady, včetně *situs inversus*

(Takeda et al., 1999). Podobný fenotyp lze pozorovat u mutantů s chybějícím proteinem KIF3B. I u těchto jedinců v uzlu chybí cílie a jsou přítomná pouze bazální tělíska (Nonaka et al., 1998). Důvod, proč nejsou cílie v nepřítomnosti proteinů schopné vzniknout, pravděpodobně spočívá v absenci transportu dyneinu a dalších komponent cílím na místo určení (Takeda et al., 1999).

## 2.2. Posteriovní naklonění cílím

Všechny cílie buněk uzlu směřují špičkou k posteriovní straně, zatímco kořen je orientován anteriorním směrem (Cartwright et al., 2004; Nonaka et al., 2005).

Naklonění cílím k posteriovu je ovlivněno zaoblením apikální plazmatické membrány buněk uzlu a samotným umístěním bazálního tělíska, a tedy i cílím v posteriovu. (Nonaka et al., 2005; Okada et al., 2005). Vliv umístění bazálního tělíska na naklonění cílím byl potvrzen u cílím, jenž se nacházejí na anteriorní straně buněk. Tyto cílie mají bazální tělísko umístěno anteriorně a i výsledný náklon cílím je anteriorním směrem (Hashimoto et al., 2010).

Pozice bazálního tělíska a cílím je zprostředkována planární polaritou buněk (PCP, planar cell polarity), která zajišťuje přenos informace z anterioposteriovní osy do vznikající levo-pravé asymetrie právě skrz posteriovní umístění cílím. Tento způsob koordinované polarizace buněk je ustanoven pomocí konzervované signální dráhy, kdy proteiny PCP jsou asymetricky rozmístěny podél polarizační osy. Asymetrická lokalizace proteinů PCP uvnitř buňky pak určuje orientovaný růst a morfogenezi buněk v rovině (Antic et al., 2010; Hashimoto et al., 2010; Song et al., 2010). Asymetricky distribuované jsou například proteiny rodiny Dishevelled (DVL), jejíž tři členové (DVL1, DVL2, DVL3) byli lokalizováni v buňkách myšího uzlu (Beier et al., 1992; Klingensmith et al., 1996; Tsang et al., 1996). Proteiny DVL2 a DVL3 se nacházejí v posteriovu buňky a mutanti v těchto třech genech nemají bazální tělísko orientované posteriovně. Nedochozí tak ke vzniku levostranného proudu. DVL geny hrají důležitou roli v dráze nazývané jako „integrační místo související s bezkřídlym fenotypem“ (Wnt, wingless-related integration site). V případě inhibice genu *Ras příbuzný C3 botulotoxin substrát 1* (*Rac1*, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), jenž patří do Wnt nonkanonické dráhy, dojde k náhodnému umístění bazálního tělíska. Posteriovní naklonění cílím je tedy pravděpodobně zprostředkováno PCP skrz Wnt nonkanonickou dráhu (Hashimoto et al., 2010).

Dále do PCP signalizace patří Protein podobný prickle 2 (PRICKLE 2, Prickle-like protein 2) (Antic et al., 2010), Protein podobný Vang 1 (VANGL1, Vang-like protein 1) a Protein podobný Vang 2 (VANGL2, Vang-like protein 2), jež jsou umístěny v buňce anteriorně. VANGL1 a VANGL2 ovlivňují polaritu buněk a posteriovní umístění cílím, protože

v nepřítomnosti obou těchto genů dojde k narušení PCP a mutanti mají větší počet bazálních tělísek umístěných centrálně a anteriorně. Ani u těchto mutantů nevzniká levostranný proud (Antic et al., 2010; Song et al., 2010).

## **2.3. Rotace**

Pohyblivé cílie rotují ve směru hodinových ručiček (Okada et al., 2005) o frekvenci 10 Hz (Cartwright et al., 2004). Směr rotace je pravděpodobně ovlivněn orientací A-B-mikrotubulů a aktivitou ODA (Shinohara and Hamada, 2017).

Posteriovní naklonění cílií umožňuje rotaci po eliptické dráze. Pokud by cílie nebyly posteriovně nakloněny, ale byly kolmo k povrchu buňky, vzniklá trajektorie by byla kruhová (Cartwright et al., 2004; Nonaka et al., 2005; Okada et al., 2005). Některé z cílií, ale vykazují trajektorii podobnou písmenu D, což může být způsobeno větším nakloněním cílií k povrchu buňky, kdy se při pohybu dolů cílie dotkne apikálního povrchu buňky.

Rychlost rotace je závislá na velikosti úhlu. Cílie rotuje rychleji pokud svírá s povrchem buňky větší úhel. Úhel náklonu cílií od kolmé osy byl změřen jak pomocí elektronové mikroskopie:  $15^\circ - 35^\circ$  (Nonaka et al., 2005), tak spočítán ze závislosti na frekvenci a rychlosti proudu:  $5^\circ - 25^\circ$  (Cartwright et al., 2004).

## **3. Proudění v uzlu**

### **3.1. Vznik proudu**

Rotace cílií způsobuje pohyb extracelulární tekutiny v uzlu embrya a tím zde dochází k vzniku levostranného proudu (Nonaka et al., 1998).

Při rotaci jsou cílie v první fázi pohybu skoro vertikální k povrchu buňky (Okada et al., 2005). V případě, že by cílie byly kolmé k povrchu buňky a ne nakloněné, svým pohybem by pouze vytvářely vír, ale ne kontinuální proud (Cartwright et al., 2004). Při pohybu dojde k rozpočívání okolní tekutiny a vzniká silný proud směřující k levé části buňky. V druhé fázi se cílie pohybuje směrem vpravo a nachází se těsně nad apikálním povrchem buňky uzlu (Okada et al., 2005).

Levostranný proud začíná mít přímý vliv na narušení symetrie v raném embryonálním vývoji, ještě před vznikem somitů (Nonaka et al., 2002; Okada et al., 1999). Protože proud směřuje k levé straně uzlu, později dojde ke správnému levo-pravému vývoji tělní asymetrie. Funkce levostranného proudu byla dokázána při experimentálním vytvoření pravostranného

proudění, kdy dostatečně rychlý proud měl schopnost levo-pravou tělní asymetrii otočit. Navíc u jedinců s mutací *inversus viscerum (iv)*, jež se vyznačuje nepřítomností proudu a náhodnou determinací levo-pravé asymetrie, umělým vytvořením levostranného proudu vznikala normální levo-pravá asymetrie a použitím pravostranného proudění asymetrie opačná (Nonaka et al., 2002).

### 3.2. Pravostranné proudění

Kromě levostranného proudu existuje v uzlu tendence ke vzniku pravostranného proudu, ten je ale brzděn povrchem buněk a neovlivňuje hlavní levostranný proud.

Vznik pravostranného proudění vychází z uzavřené struktury uzlu, který je kryt Reichertovou membránou. Extraembryonální tekutina v uzlu, která je hnána cíliemi směrem vlevo, cirkuluje a vrací se pravostranným prouděním. Hlavní proud prochází středem této uzavřené struktury a při návratu se proud roztáhne podél stěn a dna uzlu. Tento zpětný pravostranný proud je pomalejší vlivem interakcí s povrchem buněk (Cartwright et al., 2004).

Lokální pravostranné proudění by také mělo teoreticky vznikat při rotaci každé jednotlivé cílie. Když je cílie v první fázi pohybu, okolní tekutina se pohybuje vlevo, zatímco ve druhé fázi by pohyb tekutiny měl směřovat vpravo. Zde se ale vlivem interakcí tekutiny s povrchem buněk uzlu vytvoří statická vrstva a pohyb tekutiny je zabrzděn. Vliv statické vrstvy na pohyb cílie byl potvrzen zjištěním, že posteriorně nakloněné cílie vytváří levostranný proud, aniž by byl zaznamenán pravostranný proud u povrchu buněk uzlu (Blake and Sleight, 1974; Nonaka et al., 2005).

### 3.3. Vliv Inversinu na funkci cílů

Mutace „*inversion of embryonic turning*“ (*inv*, inverze embryonálního otočení) je recesivní mutací genu pro Inversin, u níž homozygoti *inv*<sup>-/-</sup> vykazují ze 100 % *situs inversus*, tedy obrácené umístění vnitřních orgánů. Ve wild-type myším embryu dochází k rotaci embrya z lordotické orientace do fetální pozice v období E8.5 – E9.5, ale u těchto mutantů je rotace obrácená, což způsobí opačný vývoj levo-pravé tělní asymetrie.

Tato mutace byla vytvořena vložením krátkého genového úseku do sekvence nacházející se na chromozomu 4 transgenní myši (Yokoyama et al., 1993), což vedlo k deleci a duplikaci v této oblasti (Morgan et al., 1998 podle Yokoyama et al., 1995). Při deleci dochází ke ztrátě

většiny kódující sekvence genu pro Inversin, jehož ztráta se ukázala jako kritická pro vznik mutace (Mochizuki et al., 1998; Morgan et al., 1998).

Protein Inversin se vyskytuje pouze v cíliích s 9+0 strukturou, tedy i v cíliích uzlu. Nachází se v celé délce cílie a pravděpodobně má dosud neznámý vliv na generaci proudu cíliemi. Při srovnání cílií postrádající Inversin a cílií s wild-type genotypem nebyly zjištěny žádné rozdíly v délce a stavbě cílie (Watanabe et al., 2003). Nejdůležitější změna fenotypu byla zjištěna při pozorování proudu. Homozygotní *inv*<sup>-/-</sup> sice rotující cílie mají, ale vznikající proud je velmi slabý. Rychlost rotace u heterozygotů, homozygotů *inv*<sup>-/-</sup> i u wild-type je srovnatelná, ale vznikající proud u homozygotů nemá tak hladký průběh a je pomalejší. Proud u těchto mutantů má podobný charakter jako 3. nebo 4. fáze vývoje cílií. Není jasné, jak tato mutace ovlivňuje vznikající proud. Jedna z možností je, že dochází k narušení koordinace cílií. Dále byla zjištěna u *inv*<sup>-/-</sup> mutantů aberantní masa buněk v uzlu, což lze teoreticky zvážit jako příčinu netypického proudění (Okada et al., 1999).

Při dalším pozorování bylo zjištěno, že zatímco homozygoti v genu *inv* mají až 20 % cílií nakloněných anteriorně, u heterozygotních jedinců nemá mutace na orientaci cílií žádný vliv. Anteriorně nakloněné cílie *inv*<sup>-/-</sup> jedinců pravděpodobně rotují opačným směrem a vytváří lokální pravostranný proud. Tato mutace ovlivňuje i pohyblivost cílií. Zatímco běžně je nepohyblivých cílií v uzlu kolem 10 %, u heterozygotů a homozygotů to může být až 30 %. Také zde může dojít k otočení rotace některých cílií proti směru hodinových ručiček (Okada et al., 2005).

## 4. Vnímání proudu cíliemi

### 4.1. Chemosenzitivní model

#### 4.1.1. Morfogenový model

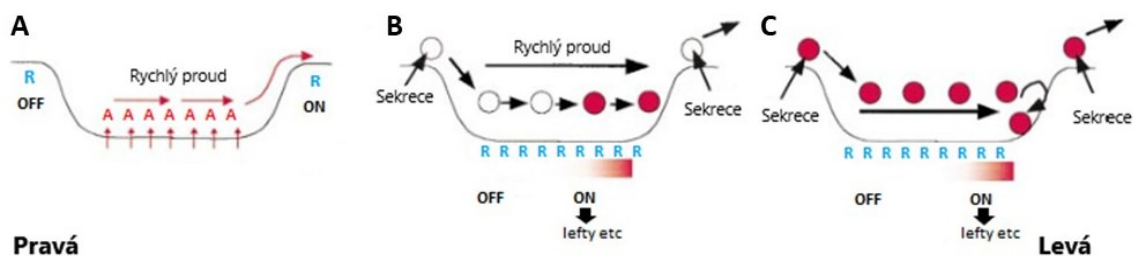
O existenci chemosenzitivního vnímání cílií začal jako první uvažovat Nonaka při objevení levostranného proudění. Předpokládal, že tento proud slouží k transportu sekretovaného faktoru, který dále spouští signalizační kaskádu uvnitř buněk v levé části uzlu (Nonaka et al., 1998).

V tomto modelu jsou morfogeny uvolněné do extraembryonální tekutiny nesené do levé části uzlu, čímž vzniká koncentrační gradient (Okada et al., 1999). Velikost morfogenů byla experimentálně určena pomocí fluorescenčně značených částic odpovídajících velikosti 20 kDa, které byly vpraveny do uzlu. Proud o rychlosti  $1,5-2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  tyto částice

transportoval uzlem a vznikl zde patrný rozdíl v asymetrické distribuci těchto částic. U menších částic došlo k časnější difuzi a jejich rozložení bylo více symetrické. Proteinový gradient by tak mohl být tvořen proteiny o velikosti přibližně 20 kDa s difuzním koeficientem  $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , které by se tak stihly přepravit proudem dříve, než dojde k jejich difuzi (Okada et al., 2005).

Tato teorie byla také podpořena při experimentování s mutanty v genu pro Inversin, pro něž je typická přítomnost slabého levostranného proudění a otočená levo-pravá tělní asymetrie. U wild-type jedinců trvá částici vložené na pravou stranu uzlu přibližně 5 s, než se pomocí proudu přesune na levou stranu. U *inv*<sup>-/-</sup> mutantů je většina částic chycena lokálními víry cílí a do levé části se dostane <10 % částic. U těchto mutantů tedy nemůže vzniknout stejný gradient morfoгенů, a to vede k obrácenému vývoji levo-pravé tělní asymetrie.

Na základě této teorie bylo vytvořeno několik modelů vzniku proteinového gradientu (Obrázek 3). Model „výtoku“ (flow-out) předpokládá, že morfoгенy vznikají v uzlu a interagují s receptory v okolí uzlu. V modelu „vtoku“ (flow-in) jsou morfoгенy sekretovány z buněk v okolí uzlu a receptory se nacházejí v uzlu. V tomto případě ale musí existovat mechanismus, který by zabránil navázání morfoгенů na receptory hned po vstupu do oblasti uzlu. V modelu „opožděné aktivace“ (delayed activation model) jsou morfoгенy aktivovány až několik sekund po uvolnění z povrchu buněk poté, co jsou rozneseny proudem. Model „pomalé vazby“ (slow binding model) uvažuje o pomalém navázání morfoгенů na receptory po transportu (Okada et al., 1999).



**Obrázek 3: Modely vzniku proteinového gradientu.** A) Model „výtoku“. Morfoгенy jsou uvolňovány z buněk uzlu a vážou se na receptory mimo uzlu. B) a C) Modely „vtoku“. Morfoгенy se sekretují z buněk v okolí uzlu a následně se vážou na receptory v uzlu. B) Model „opožděné aktivace“. Morfoгенy jsou uvolňovány v neaktivní formě (bílá barva) a aktivují se až v pravé části uzlu (červená barva). C) Model „pomalé vazby“. Morfoгенy se pomalu vážou na své receptory v levé části uzlu až po transportu levostranným proudem. A – morfoген, R – receptor (převzato a upraveno podle Okada et al., 1999).

Pozdější studie se přiklání k modelu, kde je důležitá difúze morfogenu, která tak oddalí kontakt s receptorem. Molekuly jsou uvolňovány z okrajů uzlu, rozneseny proudem a po jejich difuzi a kontaktu s receptory vzniká v uzlu gradient. U *inv* mutantů, u nichž je proud pomalejší, došlo k difuzi částic dříve, než byly dopraveny k buňkám v levé části uzlu. V tomto případě interagují s receptory na pravé straně a spustí zde signální kaskádu, která vyústí v obrácený vývoj tělní asymetrie (Cartwright et al., 2004).

#### 4.1.2. NVP

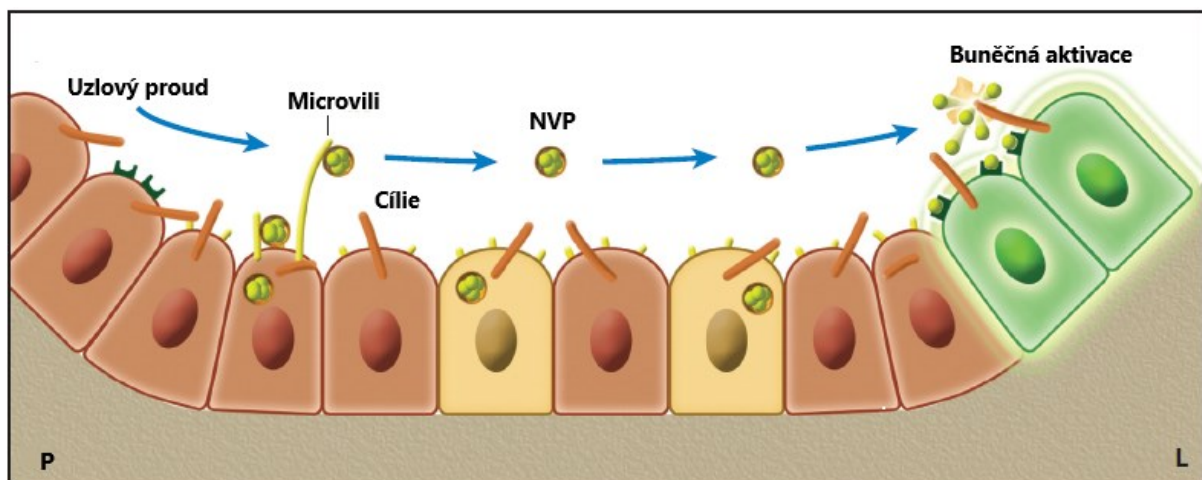
Speciálním případem chemosenzitivní teorie je předpoklad, že gradient podél levo-pravé osy je tvořen membránovými váčky pojmenovanými jako uzlové vezikulární váčky (NVP, nodal vesicular parcels).

Tyto váčky o velikosti 0,3 – 0,5  $\mu\text{m}$  jsou tvořeny lipofilním jádrem obaleným membránou a jejich vznik probíhá v mikrovilách, kde jsou plněny morfogeny Sonic hedgehog (SHH) a Retinovou kyselinou (RA, Retinoic acid) a postupně uvolňovány každých 5 – 15 s. Naložení těchto morfogenů do váček slouží jako signál k uvolnění NVP z mikrovil nejspíš pomocí membránového Dispatched proteinu (Kawakami et al., 2002; Tanaka et al., 2005). Dodání morfogenů z Golgiho aparátu do váček je patrně ovlivněno signalizací Fibroblastovým růstovým faktorem (FGF, fibroblast growth factor). Receptory fibroblastového růstového faktoru (FGFR1, -2, -3, fibroblast growth factor receptor 1,-2,-3) se nacházejí na povrchu všech buněk uzlu.

Existují 3 modely popisující uvolnění NVP z buňky založené na existenci velice senzitivního mechanismu zajišťujícího vznik normální levo-pravé asymetrie i za přítomnosti slabého proudu generovaného pouze dvěma rotujícími cíliemi (Shinohara et al., 2012). V modelu „uvolnění v blízkosti cílů“ (near cilium release model) se částice uvolňují z povrchu buněk, posteriorně přiléhajících k pohyblivým cílům. Na takový povrch je vyvíjen silný tlak z rotujících cílů, a to vede k uvolnění váček. (Gallagher et al., 2020; Solowiej-Wedderburn et al., 2019). V tomto modelu ale dvě ani více pohyblivých cílů nedokážou vytvořit požadovaný gradient z částic, který by vedl ke správnému vývoji levo-pravé asymetrie. Další možností je model „uvolnění cíliemi“ (cilium release model), který předpokládá, že jsou částice uvolňované jen buňkami pohyblivých cílů. Ani v tomto modelu, ale dvě pohyblivé cíle nebyly schopné vytvořit požadovaný gradient. Nejpravděpodobnější se tedy jeví model „rovnoměrného uvolnění“ (uniform release model), v němž jsou částice uvolňovány náhodně

ze všech buněk uzlu. V tomto případě i jedna pohyblivá cílie stačí k vytvoření levo-pravého gradientu částic a tento gradient v levé části uzlu stoupá s vyšším počtem cílí (Gallagher et al., 2020).

NVP jsou poté transportovány levostranným prouděním a po dosažení levé strany uzlu se rozpadnou na malé částice (Obrázek 4). Rozpad váčků může být způsoben mechanicky po střetnutí s cíliemi nebo povrchem buněk (Tanaka et al., 2005) anebo dosud neznámým biochemickým procesem, který způsobí rozpad váčku na přesně daném místě uzlu (Cartwright et al., 2007). K rozpadu malé části NVP dochází i v jiných částech uzlu, což je pravděpodobně způsobeno tím, že se váčky při uvolnění z mikrovil nedostanou do hlavního proudu, ale jsou zachyceny lokálním vírem cílie. Většina NVP se ale rozpadne po dopravení k levé stěně uzlu a váček splyne se zdmi uzlu za současného uvolnění morfogenů (Cartwright et al., 2007; Tanaka et al., 2005).



**Obrázek 4: Teorie uzlových vezikulárních váčků.** Váčky obsahující morfogeny jsou uvolňovány mikrovili, a poté prouděním přesunuty do levé části uzlu, kde se rozpadnou a indukují signalizaci v buňkách (převzato a upraveno podle Smith et al., 2019).

V levé oblasti uzlu následně dochází k intracelulárnímu výlevu  $\text{Ca}^{2+}$ , který se šíří do levého laterálního mezodermu (LPM, lateral plate mesoderm) skrz endodermální buňky (McGrath et al., 2003; Tanaka et al., 2005). Inhibicí FGF signalizace dojde k zastavení tvorby NVP a výlevu  $\text{Ca}^{2+}$  v levé části uzlu, ale experimentálně lze výlev  $\text{Ca}^{2+}$  obnovit přidáním RA a SHH. Tyto dva morfogeny, naložené do NVP pomocí FGF signalizace, tedy po rozpadnutí NVP a interakci s cíliemi indukují intracelulární výlev  $\text{Ca}^{2+}$  v buňkách uzlu (Tanaka et al., 2005).

## 4.2. Mechanosenzitivní model

Jako první se o mechanosenzitivním modelu zmínil Okada jako o alternativě k jeho chemosenzitivnímu modelu vnímání cílů. Podle tohoto modelu proud mechanicky vyvolá signalizační odpověď v jamkových buňkách. (Okada et al., 1999). Na druhou stranu Brueckner se přiklání spíše k možnosti, že mechanosenzorickou funkci přejímají cíle na povrchu buněk v okolí uzlu (Brueckner, 2001).

### 4.2.1. Model dvou cílů

Objevení dvou rozdílných populací buněk v uzlu vedlo k rozvoji mechanosenzitivního modelu. Tento model, později pojmenovaný jako model dvou cílů “two-cilia model” (Tabin and Vogan, 2003), vychází z přítomnosti pohyblivých cílů v centrální oblasti uzlu a nepohyblivých cílů na periferii (McGrath et al., 2003).

Tento model potvrzují i dřívější výzkumy, které se v názoru na pohyblivost cílů odlišují. Bellomo při výzkumu cílů uzlu neobjevil dyneinová ramena, proto usuzoval, že tyto cíle jsou nepohyblivé (Bellomo et al., 1996). Později ale další výzkumy prokázaly, že cíle uzlu pohyblivé jsou (Nonaka et al., 1998; Sulik et al., 1994) a pohyb je umožněn mimo jiné i přítomným ODA (Shinohara et al., 2015). Přestože tyto výzkumy podporují myšlenku přítomnosti dvou druhů cílů v uzlu, neexistuje žádný výzkum potvrzující, že by za nepohyblivost cílů na periferii uzlu opravdu mohlo chybět ODA (McGrath et al., 2003).

#### 4.2.1.1. Pohyblivé cíle

Pohyblivé cíle se nacházejí na povrchu buněk uprostřed uzlu, které byly později pojmenované jako jamkové buňky (Yoshida et al., 2012). Cíle těchto buněk generují levostranné proudění (McGrath et al., 2003).

Tyto cíle se od nepohyblivých cílů odlišují především přítomností molekulového motoru Levo-pravý dynein (LRD, Left-right dynein), který umožňuje pohyb cíle (McGrath et al., 2003; Supp et al., 1999). Gen pro tento protein se nachází na chromozomu 12 a je jedním z genů kódující těžký řetězec ODA. Pro tento gen byly zjištěny dvě alelické mutace *legless (lgl)* a *iv* (Brueckner et al., 1989; Singh et al., 1992; Supp et al., 1997, 1999). Mutace *iv* vzniká nahrazením kyseliny glutamové v konzervované pozici za lysin, zatímco mutace *lgl* je produktem transgenní inserce, při níž dochází k deleci kódující sekvence (McNeish et al., 1988; Supp et al., 1997). U obou mutací dochází ke ztrátě funkčnosti genu *Lrd*, což má za následek nepohyblivost cílů uzlu, které nevytváří levostranné proudění (McGrath et al., 2003;

Okada et al., 1999; Supp et al., 1997, 1999). Funkce LRD proteinu byla potvrzena zjištěním, že se protein vyskytuje v buňkách uzlu pouze v období E7,5 – E8,0, což je období, které odpovídá přítomnosti uzlového proudění (McGrath et al., 2003). Nepřítomnost proudění v uzlu způsobuje *situs inversus* u 50 % mutantů *iv<sup>-/-</sup>* a *lgl<sup>-/-</sup>* (Hummel and Chapman, 1959; Layton, 1976; McNeish et al., 1990; Singh et al., 1992).

#### **4.2.1.2. Nepohyblivé cílie**

Buňky s nepohyblivými cíliemi se nachází v krajních oblastech uzlu, a to hlavně v levé, pravé a anteriorní části. Z průměrného počtu všech cílií v uzlu (130–210 cílií) jich je nepohyblivých 31–40 % (McGrath et al., 2003). Tyto buňky jsou pravděpodobně ty samé jako ty, jež byly později pojmenovány uzlové korunkové buňky. U těchto buněk se předpokládá, že jejich cílie mají mechanosenzorickou nebo chemosenzorickou funkci (Odate et al., 2016) a k vnímání proudu využívají přítomné polycystinové kanály (McGrath et al., 2003; Yoshida et al., 2012).

Role uzlových korunkových buněk ve vnímání proudu byla dokázána pomocí mutantních *Kif3a<sup>-/-</sup>* jedinců. Tyto mutanti postrádají všechny cílie v uzlu, ale pokud byla v uzlových korunkových buňkách transgenně upravena exprese genu *Kif3a* a cílie zde vznikaly, byly schopny vnímat proud, který byl vytvářen činností několika málo pohyblivých cílií uzlových korunkových buněk (Yoshida et al., 2012).

#### **4.2.2. Polycystin-2**

##### **4.2.2.1. Funkce Polycystinu-2**

Protein Polycystin-1, kódovaný genem *Pkd1* (The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995), a jemu podobný protein Polycystin-2, který je kódovaný genem *Pkd2*, byly objeveny v tubulech ledvin (Mochizuki et al., 1996).

Membránový protein Polycystin-1 skrz extracelulární N-terminální doménu zprostředkovává interakce buňky s matrix nebo dalšími buňkami (The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995), zatímco transmembránový Polycystin-2 s 6 doménami vytváří vápník uvolňující kanál aktivovaný vápníkem na endoplazmatickém retikulu (González-Perrett et al., 2001; Koulen et al., 2002). Polycystin-2 se v nepřítomnosti Polycystinu-1 vyskytuje v buňce, ale v přítomnosti tohoto proteinu dochází k jeho translokaci do plazmatické membrány, kde společně vytvoří neselektivní vápník propustný kanál

(Hanaoka et al., 2000). Oba tyto proteiny spolu interagují skrz C-konce v intracelulární oblasti a Polycystin-1 reguluje kanálovou aktivitu Polycystinu-2 (Qian et al., 1997). Podrobnější fungování polycystinových proteinů objasnili až studie zabývající se vnímáním proudu primárními cíliemi ledvinového epitelu. Polycystin-1 a Polycystin-2 zde vytváří heterodimer na plazmatické membráně a Polycystin-1 je schopný skrz svoji extracelulární doménu reagovat na tlak vyvíjený na cílii proudem. Tuto informaci přeneše na iontový kanál Polycystin-2, který umožní extracelulárním  $\text{Ca}^{2+}$  iontům vstup do buňky.  $\text{Ca}^{2+}$  pak aktivuje vápníkem aktivované kanály na membráně vnitřních organel, což vede k uvolnění zásob  $\text{Ca}^{2+}$  buňky. Tento signál se může šířit do sousedních buněk skrz gap-junctions. Změna v koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  uvnitř buňky může vést ke změnám genové exprese, růstu buňky nebo organogenezi (Nauli et al., 2003; Praetorius and Spring, 2001).

#### 4.2.2.2. Polycystin-2 v cíliích uzlu

Polycystin-2 se nalézá jak v nepohyblivých cíliích uzlových korunkových buněk, tak i v pohyblivých cíliích jamkových buněk.

Protein je v buňkách uzlu přítomen již v období před vznikem somitů, kdy začíná exprese genů ovlivňující vývoj levo-pravé asymetrie. První zpozorování v cytoplazmě a ER je v období E7.5 - E8.0 a od E7.75 je protein přítomen navíc i v cíliích. V tomto stupni vývoje je většina cílií uzlových korunkových buněk nepohyblivých (až 90 %), zatímco cílie jamkových buněk jsou z 60% pohyblivé (McGrath et al., 2003; Yoshida et al., 2012).

Tak jako v cíliích ledvinového epitelu i zde je pro fungování kanálu důležitá interakce Polycystinu-2 s dalším proteinem (Field et al., 2011). Tím je v uzlových cíliích protein Polycystin-1-like-1 (*Pkd11l*) z rodiny polycystinových proteinů. Jedná se o protein s 11 transmembránovými doménami (Yuasa et al., 2002), který s Polycystinem-2 interaguje skrz C-terminální doménu (Field et al., 2011).

Vztah těchto dvou proteinů v uzlových cíliích není úplně jasný. Gen *Pkd11l* funguje upstream oproti genu *Pkd2*, a protože mutanti postrádající *Pkd11l* vykazují oboustrannou expresi Nodal signálační dráhy, lze předpokládat, že *Pkd11l* potlačuje kanálovou aktivitu *Pkd2*. Ve wild-type jedincích je represe narušená levostranným prouděním a umožňuje aktivaci *Pkd2* a spuštění Nodal signálační dráhy jen v levé části uzlu (Grimes et al., 2016).

Další možností je, že spolu tyto dva proteiny interagují a vytváří polycystinový vápníkový kanál, který po mechanické stimulaci nepohyblivých cílií levostranným proudem generuje uvolňování intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ . Frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  v buňkách uzlu osciluje během vývoje. V časném stádiu hlavového výrůstku je distribuce v uzlu symetrická na levé i pravé

straně, ale v pozdějším stádiu hlavového výrůstku je frekvence signálu výrazně vyšší v levé krajní části uzlu, což odpovídá levostrannému proudění, které se vyskytuje v této fázi (McGrath et al., 2003; Nonaka et al., 1998; Takao et al., 2013).

Vysoká hladina intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  v levé části uzlu, zprostředkovaná kanálem *Pkd2/Pkd111*, stimuluje spuštění Nodal signalizační dráhy, která ovlivňuje vývoj levo-pravé osy (Field et al., 2011; Pennekamp et al., 2002; Takao et al., 2013).

Význam  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace byl objasněn u zkoumání *Pkd2* mutantů, kteří postrádají iontový kanál. Hladina intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  v uzlových buňkách je u těchto mutantů mnohem nižší než u wild-type jedinců a její rozprostření v uzlu je symetrické (Takao et al., 2013). A protože u *Pkd2* mutantů byl v pozdějším stádiu vývoje zjištěn náhodný vývoj levo-pravé asymetrie těla nebo některých orgánů, lze předpokládat, že je to způsobeno nedostatečnou silou  $\text{Ca}^{2+}$  signálu v levé části uzlu. (Pennekamp et al., 2002).

Navzdory všem důkazům, že cílie reagují na mechanický tlak zvýšením vtoku vápníku skrz polycystinové kanály, což indukuje uvolnění intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ , byla tato funkce cílií zpochybněna v jedné studii. Zde totiž při experimentálním vytvoření proudění, které stimuluje korunkové buňky, nedocházelo ke zvýšení vápníku uvnitř cílií. K pozorovanému zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  docházelo v cytoplazmě a vápník pak rychle difundoval do cílií. Pokud tedy asymetrická exprese genů v buňkách uzlu probíhá mechanosenzitivním vnímáním, nehrají zde roli polycystinové kanály cílií (Delling et al., 2016).

## 5. Nodal signalizační dráha

### 5.1. NODAL

Proudění, které vzniká v uzlu činností cílií, aktivuje Nodal signalizační dráhu v levé straně uzlu a tím zahájí procesy vedoucí k asymetrickému rozložení tělních orgánů (Collignon et al., 1996; Logan et al., 1998; Lowe et al., 1996; McGrath et al., 2003; Nonaka et al., 1998; Okada et al., 2005; Ryan et al., 1998).

Prvním členem aktivovaným touto signalizací je gen *Nodal*. Patří do rodiny Transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ , Transforming growth factor- $\beta$ ) (Zhou et al., 1993), který je v uzlu slabě exprimován již v E5.5 a pravděpodobně má také význam při formaci primitivního pruhu (Conlon et al., 1994).

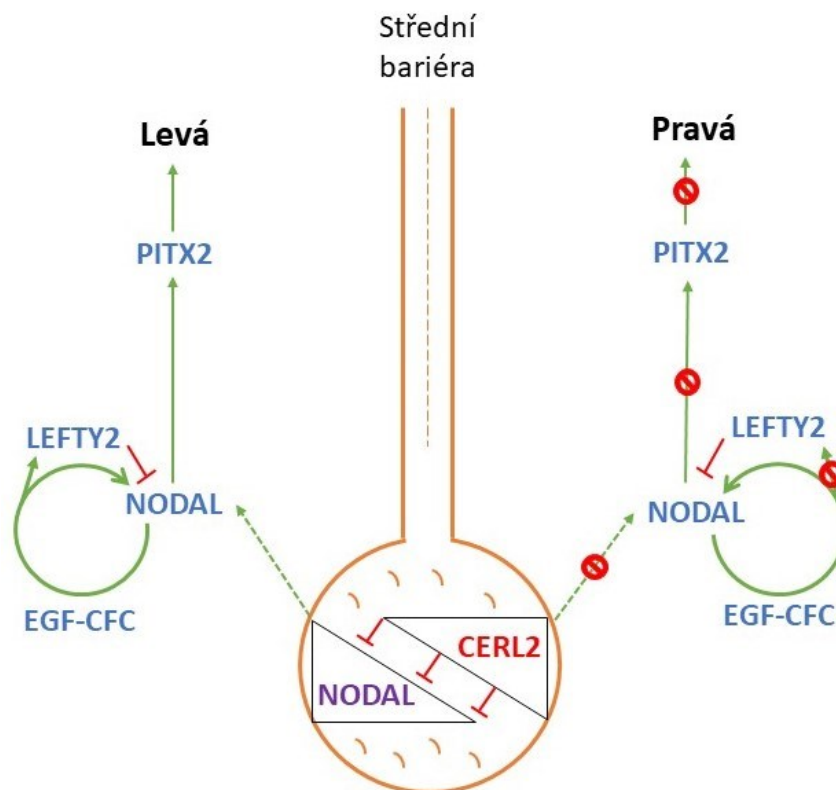
NODAL se váže na „Kinázu 4 podobnou receptoru aktivinu“ (ALK4, Activine receptor-like kinase 4) a Receptoru aktivinu typu IIA (ActRIIA, Type IIA activin receptor) nebo Receptoru aktivinu typu IIB (ActRIIB, Type IIB activin receptor) (Gu et al., 1998; Oh and Li, 1997;

Sakuma et al., 2002). Tato vazba je zprostředkována membránově vázaným koreceptorem z rodiny epidermálního růstového faktoru (EGF-CFC, Epidermal growth factor–Cripto/FRL-1/Cryptic), Cripto nebo Cryptic (Oki et al., 2007; Sakuma et al., 2002; Yeo and Whitman, 2001).

## 5.2. Regulace asymetrické genové exprese

Expres *Nodal* je regulována Hepatocytárním jaderným faktorem  $\beta$  (HNF3 $\beta$ , Hepatocyte nuclear factor  $\beta$ ), který zde funguje jako upstream aktivátor. HNF3 $\beta$  se dále podílí na formaci primitivního pruhu a uzlu (Ang and Rossant, 1994; Collignon et al., 1996; Dufort et al., 1998).

Antagonistou *Nodal* je *Cerl2* (*Cerberus-like2*), jehož exprese je vyšší v uzlových korunkových buňkách na pravé straně uzlu a vymezuje tak Nodal signální dráhu do levé části embrya (obrázek 5) (Marques et al., 2004).



**Obrázek 5: Nodal signální dráha.** Gen *Nodal* je exprimován pouze v levé části uzlu vlivem inhibice proteinem CERL2 v pravé části, a tím je umožněno pouze jednostranné spuštění Nodal signální dráhy. NODAL se dále přesouvá do levého LPM, kde pozitivně reguluje expresi genu *Nodal* a expresi genu *Lefty2*. Dále NODAL spouští expresi genu *Pitx2*, který má přímý vliv na asymetrickou organogenezi (převzato a upraveno podle Marques et al., 2014).

Zatímco exprese genu od fáze 1 somitu až do fáze 6 somitů je výrazně vyšší v uzlových korunkových buňkách v pravé části uzlu, rozložení proteinu CERL2 s expresí nekoreluje. Ve fázi 3 somitů je protein CERL2 symetricky rozložený v levé i pravé části uzlu a postupně gradient přechází do levé části uzlu. Přítomnost CERL2 na levém okraji uzlu ve fázi 4-5 somitů pravděpodobně inhibuje přítomný NODAL a signalizace poté přechází do LPM.

Levostranná distribuce proteinu odpovídá proudění v uzlu a CERL2 tak teoreticky může být jedním z morfogenů roznášeným levostranným prouděním, což podporuje chemosenzitivní teorii (Inácio et al., 2013). Na druhou stranu u *Pkd2*<sup>-/-</sup> mutantů byla exprese *Cerl2* v uzlových korunkových buňkách uzlu symetrická, což poukazuje na význam polycystinových proteinů při vnímání proudu cíliemi (Yoshida et al., 2012).

### 5.3. Přesun proteinu NODAL z uzlu do LPM

Nejprve je gen *Nodal* exprimován symetricky v uzlových korunkových buňkách, ale se vznikem somitů je exprese silnější v levé straně uzlu a postupně narůstá také v levém LPM (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996). Zde exprese probíhá pouze pokud dochází k expresi *Nodal* v buňkách (Brennan et al., 2002; Saijoh et al., 2003).

Ve fázi 4-5 somitů probíhá exprese v okrajových oblastech uzlu asymetricky a při 5-6 somitech je nejsilnější v levém LPM. Ve fázi 7-8 somitů je *Nodal* exprimován jen v anteriorní části LPM a po této fázi protein není přítomný (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996).

Šíření signálu, zprostředkované NODAL proteinem, z uzlu do LPM pravděpodobně probíhá pomocí endodermálních korunkových buněk a transport z jedné buňky do druhé je umožněn důležitým komponentem gap-junctions Connexinem 43 (Odate et al., 2016; Viotti et al., 2012). Snížená exprese Connexinu může způsobit chybějící gap-junctions ve střední čáře uzlu a zde tak vzniká bariéra, která zabraňuje průchodu proteinů z levé do pravé strany a naopak (Viotti et al., 2012).

Protein NODAL při transportu do levého LPM interaguje se složkami bazálních membrán, sulfatovanými glykosaminoglykany (Oki et al., 2007), a dále s Růstovým diferenciačním faktorem 1 (GDF-1, Growth/differentiation factor-1). *Gdf-1* je symetricky exprimován v uzlových korunkových buňkách a LPM a při signalizaci pravděpodobně dochází ke vzniku NODAL-GDF-1 heterodimeru, který zesiluje NODAL aktivitu a umožňuje transport NODAL do levého LPM (Rankin et al., 2000; Tanaka et al., 2007).

## 5.4. Exprese genů v LPM

## 5.5. LEFTY

Po transportu NODAL do levého LPM je protein schopný autoregulačním mechanismem aktivovat expresi genu *Nodal* a indukovat expresi genu pro Levo-pravý determinační faktor 2 (LEFTY2, Left-right determination factor 2) (Obrázek 5) vazbou na jejich enhancer specifický pro levou stranu (ASE, left side-specific enhancer) (Norris and Robertson, 1999; Saijoh et al., 1999, 2000).

Gen pro LEFTY2 a jemu podobný gen pro Levo-pravý determinační faktor 1 (LEFTY1, Left-right determination factor 1) patří ke genům rodiny TGF- $\beta$  a oba geny ovlivňují vývoj levo-pravé osy (Meno et al., 1996, 1997). Geny se nacházejí na myším chromozomu 1 a jejich maturované proteiny obsahují až 97 % homologních aminokyselinových zbytků. Symetrická exprese *Lefty-2* je pozorovaná již v E7.0, ale asymetrická exprese obou genů se vyskytuje až se vznikem somitů v E8.0. Zatímco *Lefty-1* je především exprimován v levé části budoucí nervové ploténky (PFP, prospective floorplate) a ve velmi malé míře v levém LPM, *Lefty-2* vykazuje nejsilnější expresi v levém LPM a velmi slabou expresi v levé části PFP (Meno et al., 1997).

*Lefty-1* je antagonistou *Nodal* a jeho přítomnost v PFP vytváří bariéru, která zamezuje šíření *Nodal* do pravé části uzlu a vymezuje tak jeho expresi do levé části uzlu a levého LPM (Meno et al., 1998; Nakamura et al., 2006). LEFTY-2 poté v levém LPM skrz negativní zpětnou vazbu zastavuje již probíhající expresi *Nodal* (Meno et al., 1999). Proteiny LEFTY mohou NODAL inhibovat různými způsoby – navázáním se na jeho receptory ActRIIA a ActRIIB (Sakuma et al., 2002), vazbou s kofaktorem z rodiny EGF-CFC, kterému tak není umožněna interakce s proteinem NODAL (Chen and Shen, 2004; Cheng et al., 2004), anebo navázáním se na samotný NODAL (Chen and Shen, 2004).

## 5.6. PITX2

Protein NODAL dále iniciuje expresi genu pro Hypofyzární homeobox 2 (PITX2, Pituitary homeobox 2) v levém LPM (Obrázek 5) navázáním se na ASE, který se nachází na intronu tohoto genu. ASE také obsahuje vazebné místo pro transkripční faktor Nk2 homeobox 5 (NKX2-5, Nk2 homeobox 5), který udržuje expresi *Pitx2* v pozdějším stádiu vývoje i bez přítomnosti NODAL (Shiratori et al., 2001, 2006).

*Pitx2* je asymetricky exprimovaný transkripční faktor, který iniciuje asymetrickou organogenezi některých orgánů krátce po vymizení NODAL z levého LPM (Logan et al., 1998;

Ryan et al., 1998). Exprese *Pitx2* v levém LPM začíná ve fázi 2-3 somitů a je znatelná ještě ve fázi 8-9 somitů. Poté se asymetrická exprese *Pitx2* přesouvá do orgánů, jenž jsou asymetrické podle levo-pravé osy. Příkladem je exprese *Pitx2* v levé polovině vyvíjejícího se srdce a gastrointestinálního traktu. Silná levostranná exprese také může v pozdějším stádiu vývoje ovlivnit směr embryonální rotace (Logan et al., 1998; Ryan et al., 1998; Shiratori et al., 2006; Yoshioka et al., 1998).

## 5.7. Nodal signalizační dráha a *iv*, *inv* mutanti

Role *Nodal* při určení levo-pravé asymetrie byla potvrzena při pozorování asymetrické exprese v *iv* a *inv* mutantech. Cíle *inv* mutantů vytváří pouze slabý levostranný proud (Okada et al., 1999) a k expresi genu *Nodal* dochází jen v pravém LPM (Lowe et al., 1996), které odpovídá i expresi genu *Pitx2* (Ryan et al., 1998). Výsledkem je *situs inversus* u 100 % jedinců (Yokoyama et al., 1993).

U *iv* mutantů, u nichž proud nevzniká vůbec, se *situs inversus* vyskytuje přibližně v 50 % případů (Hummel and Chapman, 1959; Layton, 1976; Okada et al., 1999) a exprese genu probíhá v levém i pravém LPM, ale také exprese není přítomná vůbec nebo oboustranně. (Lowe et al., 1996). I zde exprese *Pitx2* probíhá ve stejných místech jako exprese *Nodal*.

Levostranné proudění a následně indukovaná asymetrická exprese Nodal signalizační dráhy tedy koreluje s budoucím vývojem levo-pravé asymetrie tělních orgánů (Campioni et al., 1999; Ryan et al., 1998).

## Závěr

Tato práce se zaměřuje na otázku, jakým způsobem dochází k indukci levo-pravé asymetrické genové exprese v buňkách uzlu. Prvním krokem ve spuštění asymetrické genové exprese je vznik levostranného proudění extracelulární tekutiny, které vytváří rotující cílie uzlových buněk. Není ale jasné, jestli tyto cílie vnímají informaci z proudu chemosenzitivním nebo mechanosenzitivním vnímáním, i když v živočišném těle byla prokázána existence obou způsobů. Cílie fungující jako chemoreceptory, byly objeveny například v epitelu dýchacích cest, zatímco cílie s funkcí mechanoreceptorů reagují na proud v ledvinném epitelu. Oba tyto způsoby percepce byly hojně zkoumány v buňkách uzlu a daly základ dvěma hlavním modelům.

Objevení pohyblivých a nepohyblivých cílí v uzlu vedlo ke vzniku mechanosenzitivního modelu. Proudění, vznikající pohyblivými cíliemi jamkových buněk, vede k otevření polycystinových vápníkových kanálů nepohyblivých cílí v buňkách na periférii uzlu a tím dojde k přílivu  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk, který zde iniciuje další děje v buňce. Vzhledem k přítomnosti proteinu Polycystin-2 i v pohyblivých cílích je ale možné, že vnímání proudu není omezeno pouze na uzlové korunkové buňky. Funkce polycystinových kanálů v buňkách uzlu byla zpochybněna výzkumem, který tvrdí, že při stimulaci kanálu nedochází ke vstupu vápníku do buňky skrz tyto kanály (Delling et al., 2016). Pokud by tedy mechanosenzitivní model byl pravdivý, je potřeba objasnit, jakým způsobem cílie reagují na tlak.

Chemosenzitivní model předpokládá existenci morfogenu, který vazbou na receptory v levé části uzlu aktivuje genovou expresi. Stejně jako pro model mechansense je i zde stěžejní nárůst  $\text{Ca}^{2+}$  signálu v levé straně uzlu, který je pravděpodobně zodpovědný za levostranné zahájení signální kaskády. Doposud ale v uzlu nebyla prokázána existence odpovídajícího morfogenu.

Odpovědí na některé rozpory ve výzkumech může být objev NVP, což jsou váčky naplněné morfogeny, které jsou unášeny proudem k levé straně uzlu, kde se rozpadnou a uvolní morfogeny. Za rozpad NVP by mohly být zodpovědné nepohyblivé cílie uzlových korunkových buněk, které fungují jako mechanosenzory (Cartwright et al., 2007).

Další důležitý objev ukázal, že pouze dvě rotující cílie jsou dostatečné k vytvoření levostranného proudu, který spustí asymetrickou genovou expresi v buňkách (Shinohara et al., 2012). Tato skutečnost byla později interpretována jako podporující mechanosenzitivní model, protože Omori et al. ve svém modelu vypočítali, že částice by se za přítomnosti pouze dvou cílí nebyly schopny transportovat proudem (Omori et al., 2018). Nedávno vydaný model

nazvaný model „rovnoměrného uvolnění“ ale dokazuje, že pokud jsou částice uvolňovány všemi buňkami uzlu, i velmi malý počet pohyblivých cílů je schopen vytvořit levo-pravý gradient těchto částic (Gallagher et al., 2020).

K objasnění, jakým způsobem dochází ke vnímání proudu, by se budoucí výzkumy měly zaměřit na detailnější prozkoumání struktury endodermálních a uzlových korunkových buněk, a tím objasnit, jakou funkci ve vnímání proudu hrají jejich nepohyblivé cíle. Další nevyjasněnou otázkou je, jakým způsobem uvolněné morfogeny reagují s povrchem buněk, pokud zde nehrají roli polycystinové kanály.

Prohloubení poznatků o vnímání proudu cíliemi v uzlu myši by v budoucnu mohlo pomoci pochopit vznik normální i otočené orientace vnitřních orgánů i v lidském těle.

## Použitá literatura

- Afzelius, B. (1959). Electron Microscopy of the Sperm Tail Results Obtained with a New Fixative. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 269–278.
- Ang, S.-L., and Rossant, J. (1994). HNF-3 $\beta$  is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78, 561–574.
- Antic, D., Stubbs, J.L., Suyama, K., Kintner, C., Scott, M.P., and Axelrod, J.D. (2010). Planar Cell Polarity Enables Posterior Localization of Nodal Cilia and Left-Right Axis Determination during Mouse and *Xenopus* Embryogenesis. *PLoS ONE* 5 (2), e8999
- Barnes, B.G. (1961). Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis. *J. Ultrastruct. Res.* 5, 453–467.
- Bangs, F.K., Schrode, N., Hadjantonakis, A.-K., and Anderson, K.V. (2015). Lineage specificity of primary cilia in the mouse embryo. *Nat. Cell Biol.* 17, 113–122.
- Beier, D.R., Dushkin, H., and Sussman, D.J. (1992). Mapping genes in the mouse using single-strand conformation polymorphism analysis of recombinant inbred strains and interspecific crosses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9102–9106.
- Bellomo, D., Lander, A., Harragan, I., and Brown, N.A. (1996). Cell proliferation in mammalian gastrulation: The ventral node and notochord are relatively quiescent. *Dev. Dyn.* 205, 471–485.
- Blake, J.R., and Sleight, M.A. (1974). Mechanics of ciliary locomotion. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 49, 85–125.
- Bonnafe, E., Touka, M., AitLounis, A., Baas, D., Barras, E., Ucla, C., Moreau, A., Flamant, F., Dubruille, R., Couble, P., et al. (2004). The Transcription Factor RFX3 Directs Nodal Cilium Development and Left-Right Asymmetry Specification. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4417–4427.
- Brennan, J., Norris, D.P., and Robertson, E.J. (2002). Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes Dev.* 16, 2339–2344.
- Brueckner, M. (2001). Cilia propel the embryo in the right direction. *Am. J. Med. Genet.* 101, 339–344.
- Brueckner, M., D'Eustachio, P., and Horwich, A.L. (1989). Linkage mapping of a mouse gene, *iv*, that controls left-right asymmetry of the heart and viscera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5035–5038.
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., Bebbler, F. van, Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R., et al. (1999). The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* 126, 1225–1234.
- Cartwright, J.H.E., Piro, O., and Tuval, I. (2004). Fluid-dynamical basis of the embryonic development of left-right asymmetry in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7234–7239.
- Cartwright, J.H.E., Piro, N., Piro, O., and Tuval, I. (2007). Embryonic nodal flow and the dynamics of nodal vesicular parcels. *J. R. Soc. Interface* 4, 49–56.
- Caspary, T., Larkins, C.E., and Anderson, K.V. (2007). The Graded Response to Sonic Hedgehog Depends on Cilia Architecture. *Dev. Cell* 12, 767–778.

- Chen, C., and Shen, M.M. (2004). Two Modes by which Lefty Proteins Inhibit Nodal Signaling. *Curr. Biol.* *14*, 618–624.
- Cheng, S.K., Olale, F., Brivanlou, A.H., and Schier, A.F. (2004). Lefty Blocks a Subset of TGF $\beta$  Signals by Antagonizing EGF-CFC Coreceptors. *PLoS Biol.* *2* (2), e30
- Collignon, J., Varlet, I., and Robertson, E.J. (1996). Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* *381*, 155–158.
- Conlon, F.L., Lyons, K.M., Takaesu, N., Barth, K.S., Kispert, A., Herrmann, B., and Robertson, E.J. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* *120*, 1919–1928.
- Delling, M., Indzhykulian, A.A., Liu, X., Li, Y., Xie, T., Corey, D.P., and Clapham, D.E. (2016). Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors. *Nature* *531*, 656–660.
- Dufort, D., Schwartz, L., Harpal, K., and Rossant, J. (1998). The transcription factor HNF3 $\beta$  is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis. *Development* *125*, 3015–3025.
- Field, S., Riley, K.-L., Grimes, D.T., Hilton, H., Simon, M., Powles-Glover, N., Siggers, P., Bogani, D., Greenfield, A., and Norris, D.P. (2011). Pkd111 establishes left-right asymmetry and physically interacts with Pkd2. *Development* *138*, 1131–1142.
- Gallagher, M.T., Montenegro-Johnson, T.D., and Smith, D.J. (2020). Simulations of particle tracking in the oligociliated mouse node and implications for left–right symmetry-breaking mechanics. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *375*, 20190161.
- Gibbons, I.R. (1963). Studie on the protein components of cilia from tetrahymena pyriformis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *50*, 1002–1010.
- Gibbons, I.R., and Grimstone, A.V. (1960). On Flagellar Structure in Certain Flagellates. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *7*, 697–716.
- Gibbons, I.R., and Rowe, A.J. (1965). Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science* *149*, 424–426.
- González-Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A.E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P.C., Reisin, I.L., Arnaut, M.A., and Cantiello, H.F. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1182–1187.
- Grimes, D.T., Keynton, J.L., Buenavista, M.T., Jin, X., Patel, S.H., Kyosuke, S., Vibert, J., Williams, D.J., Hamada, H., Hussain, R., et al. (2016). Genetic Analysis Reveals a Hierarchy of Interactions between Polycystin-Encoding Genes and Genes Controlling Cilia Function during Left-Right Determination. *PLoS Genet.* *12* (6), e1006070.
- Gu, Z., Nomura, M., Simpson, B.B., Lei, H., Feijen, A., van den Eijnden-van Raaij, J., Donahoe, P.K., and Li, E. (1998). The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. *Genes Dev.* *12*, 844–857.
- Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V.P., Guggino, W.B., and Germino, G.G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* *408*, 990–994.
- Hashimoto, M., Shinohara, K., Wang, J., Ikeuchi, S., Yoshida, S., Meno, C., Nonaka, S., Takada, S., Hattta, K., Wynshaw-Boris, A., et al. (2010). Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia | *Nat. Cell Biol.* *12*, 170–176

- Hummel, K.P., and Chapman, D.B. (1959). Visceral inversion and associated anomalies in the mouse. *J. Hered.* *50*, 9–13.
- Inácio, J.M., Marques, S., Nakamura, T., Shinohara, K., Meno, C., Hamada, H., and Belo, J.A. (2013). The Dynamic Right-to-Left Translocation of *Cerl2* Is Involved in the Regulation and Termination of Nodal Activity in the Mouse Node. *PLoS One* *8* (3), e60406.
- Kawakami, T., Kawcak, T., Li, Y.-J., Zhang, W., Hu, Y., and Chuang, P.-T. (2002). Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. *Development* *129*, 5753–5765.
- Kinder, S.J., Tsang, T.E., Wakamiya, M., Sasaki, H., Behringer, R.R., Nagy, A., and Tam, P.P.L. (2001). The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm. *Development* *128*, 3623–3634.
- Klingensmith, J., Yang, Y., Axelrod, J.D., Beier, D.R., Perrimon, N., and Sussman, D.J. (1996). Conservation of dishevelled structure and function between flies and mice: isolation and characterization of *Dvl2*. *Mech. Dev.* *58*, 15–26.
- Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., Ehrlich, B.E., and Somlo, S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat. Cell Biol.* *4*, 191–197.
- Layton, W.M. (1976). Random determination of a developmental process: reversal of normal visceral asymmetry in the mouse. *J. Hered.* *67*, 336–338.
- Lee, J.D., and Anderson, K.V. (2008). Morphogenesis of the node and notochord: The cellular basis for the establishment and maintenance of left–right asymmetry in the mouse. *Dev. Dyn.* *237*, 3464–3476.
- Levin, M., and Mercola, M. (1998). Gap Junctions Are Involved in the Early Generation of Left–Right Asymmetry. *Dev. Biol.* *203*, 90–105.
- Levin, M., and Mercola, M. (1999). Gap junction-mediated transfer of left-right patterning signals in the early chick blastoderm is upstream of *Shh* asymmetry in the node. *Development* *126*, 4703–4714.
- Logan, M., Pagán-Westphal, S.M., Smith, D.M., Paganessi, L., and Tabin, C.J. (1998). The Transcription Factor *Pitx2* Mediates Situs-Specific Morphogenesis in Response to Left-Right Asymmetric Signals. *Cell* *94*, 307–317.
- Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V.E., Potter, S.S., Overbeek, P., and Kuehn, M.R. (1996). Conserved left–right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* *381*, 158–161.
- Marshall, W.F., and Nonaka, S. (2006). Cilia: Tuning in to the Cell’s Antenna. *Curr. Biol.* *16*, R604–R614. \*
- Marques, S., Borges, A.C., Silva, A.C., Freitas, S., Cordenonsi, M., and Belo, J.A. (2004). The activity of the Nodal antagonist *Cerl-2* in the mouse node is required for correct L/R body axis. *Genes Dev.* *18*, 2342–2347.
- McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., and Brueckner, M. (2003). Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* *114*, 61–73.
- McNeish, J.D., Scott, W.J., and Potter, S.S. (1988). Legless, a novel mutation found in PHT1-1 transgenic mice. *Science* *241*, 837–839.

- McNeish, J.D., Thayer, J., Walling, K., Sulik, K.K., Potter, S.S., and Scott, W.J. (1990). Phenotypic characterization of the transgenic mouse insertional mutation, legless. *J. Exp. Zool.* 253, 151–162.
- Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y., and Hamada, H. (1996). Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos. *Nature* 381, 151–155.
- Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S., and Hamada, H. (1997). Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, lefty-1 and lefty-2: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes Cells* 2, 513–524.
- Meno, C., Shiono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., and Hamada, H. (1998). lefty-1 Is Required for Left-Right Determination as a Regulator of lefty-2 and nodal. *Cell* 94, 287–297.
- Meno, C., Gritsman, K., Ohishi, S., Ohfuji, Y., Heckscher, E., Mochida, K., Shiono, A., Kondoh, H., Talbot, W.S., Robertson, E.J., et al. (1999). Mouse Lefty2 and Zebrafish Antivin Are Feedback Inhibitors of Nodal Signaling during Vertebrate Gastrulation. *Mol. Cell* 4, 287–298.
- Mirvis, M., Stearns, T., and James Nelson, W. (2018). Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochem. J.* 475, 2329–2353.
- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., et al. (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339–1342.
- Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., et al. (1998). Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 395, 177–181.
- Morgan, D., Turnpenny, L., Goodship, J., Dai, W., Majumder, K., Matthews, L., Gardner, A., Schuster, G., Vien, L., Harrison, W., et al. (1998). *Inversin*, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the *inv* mouse. *Nat. Genet.* 20, 149–156.
- Nakamura, T., Mine, N., Nakaguchi, E., Mochizuki, A., Yamamoto, M., Yashiro, K., Meno, C., and Hamada, H. (2006). Generation of Robust Left-Right Asymmetry in the Mouse Embryo Requires a Self-Enhancement and Lateral-Inhibition System. *Dev. Cell* 11, 495–504.
- Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E.H., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., et al. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* 33, 129–137.
- Nicastro, D., Schwartz, C., Pierson, J., Gaudette, R., Porter, M.E., and McIntosh, J.R. (2006). The Molecular Architecture of Axonemes Revealed by Cryoelectron Tomography. *Science* 313, 944–948.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. (1998). Randomization of Left-Right Asymmetry due to Loss of Nodal Cilia Generating Leftward Flow of Extraembryonic Fluid in Mice Lacking KIF3B Motor Protein. *Cell* 95, 829–837.

- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* *418*, 96–99.
- Nonaka, S., Yoshiba, S., Watanabe, D., Ikeuchi, S., Goto, T., Marshall, W.F., and Hamada, H. (2005). De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia. *PLoS Biol.* *3* (8), e268.
- Norris, D.P., and Robertson, E.J. (1999). Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev.* *13*, 1575–1588.
- Odate, T., Takeda, S., Narita, K., and Kawahara, T. (2016). 9 + 0 and 9 + 2 cilia are randomly dispersed in the mouse node. *Microscopy* *65*, 119–126.
- Oh, S.P., and Li, E. (1997). The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev.* *11*, 1812–1826.
- Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., and Hirokawa, N. (1999). Abnormal nodal flow precedes situs inversus in *iv* and *inv* mice. *Mol. Cell* *4*, 459–468.
- Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Belmonte, J.-C.I., and Hirokawa, N. (2005). Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* *121*, 633–644.
- Oki, S., Hashimoto, R., Okui, Y., Shen, M.M., Mekada, E., Otani, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2007). Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo. *Development* *134*, 3893–3904.
- Omori, T., Winter, K., Shinohara, K., Hamada, H., and Ishikawa, T. (2018). Simulation of the nodal flow of mutant embryos with a small number of cilia: comparison of mechanosensing and vesicle transport hypotheses. *R. Soc. Open Sci.* *5*, 180601.
- Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M., and Dworniczak, B. (2002). The Ion Channel Polycystin-2 Is Required for Left-Right Axis Determination in Mice. *Curr. Biol.* *12*, 938–943.
- Praetorius, H.A., and Spring, K.R. (2001). Bending the MDCK Cell Primary Cilium Increases Intracellular Calcium. *J. Membr. Biol.* *184*, 71–79.
- Praveen, K., Davis, E.E., and Katsanis, N. (2015). Unique among ciliopathies: primary ciliary dyskinesia, a motile cilia disorder. In *F1000prime Reports*, 7.
- Qian, F., Germino, F.J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S., and Gemino, G.G. (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat. Gen.* *16*, 179–183.
- Rankin, C.T., Bunton, T., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (2000). Regulation of left-right patterning in mice by growth/differentiation factor-1. *Nat. Genet.* *24*, 262–265.
- Ryan, A.K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Peña, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., et al. (1998). *Pitx2* determines left–right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* *394*, 545–551.
- Saijoh, Y., Adachi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Hirao, A., and Hamada, H. (1999). Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left–right asymmetric expression of *lefty-1* and *lefty-2*. *Genes Dev.* *13*, 259–269.

- Saijoh, Y., Adachi, H., Sakuma, R., Yeo, C.-Y., Yashiro, K., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Kawabata, M., et al. (2000). Left–Right Asymmetric Expression of *lefty2* and *nodal* Is Induced by a Signaling Pathway that Includes the Transcription Factor *FAST2*. *Mol. Cell* 5, 35–47.
- Saijoh, Y., Oki, S., Ohishi, S., and Hamada, H. (2003). Left–right patterning of the mouse lateral plate requires nodal produced in the node. *Dev. Biol.* 256, 161–173.
- Sakuma, R., Ohnishi, Y., Meno, C., Fujii, H., Juan, H., Takeuchi, J., Ogura, T., Li, E., Miyazono, K., and Hamada, H. (2002). Inhibition of Nodal signalling by *Lefty* mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion. *Genes Cells* 7, 401–412.
- Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K., and Blum, M. (2007). Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 17, 60–66.
- Shinohara, K., and Hamada, H. (2017). Cilia in Left–Right Symmetry Breaking. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9 (10), a028282.
- Shinohara, K., Kawasumi, A., Takamatsu, A., Yoshiba, S., Botilde, Y., Motoyama, N., Reith, W., Durand, B., Shiratori, H., and Hamada, H. (2012). Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left–right symmetry in the mouse embryo. *Nat. Commun.* 3, 1–8.
- Shinohara, K., Chen, D., Nishida, T., Masaki, K., Yonemura, S., and Hamada, H. (2015). Absence of Radial Spokes in Mouse Node Cilia Is Required for Rotational Movement but Confers Ultrastructural Instability as a Trade-Off. *Dev. Cell* 35, 236–246.
- Shiratori, H., Sakuma, R., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Sakai, Y., Nishino, J., Saijoh, Y., Whitman, M., and Hamada, H. (2001). Two-Step Regulation of Left–Right Asymmetric Expression of *Pitx2*: Initiation by Nodal Signaling and Maintenance by *Nkx2*. *Mol. Cell* 7, 137–149.
- Shiratori, H., Yashiro, K., Shen, M.M., and Hamada, H. (2006). Conserved regulation and role of *Pitx2* in situs-specific morphogenesis of visceral organs. *Development* 133, 3015–3025.
- Singh, G., Supp, D., Schreiner, C., McNeish, J., Merker, H.-J., Copeland, N., Jenkins, N., Potter, S., and Scott, W. (1992). *legless* insertional mutation: Morphological, molecular, and genetic characterization. *Genes Dev.* 5, 2245–2255.
- Smith, D.J., Montenegro-Johnson, T.D., and Lopes, S.S. (2019). Symmetry-Breaking Cilia-Driven Flow in Embryogenesis. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 51, 105–128.
- Solowiej-Wedderburn, J., Smith, D.J., Lopes, S.S., and Montenegro-Johnson, T.D. (2019). Wall stress enhanced exocytosis of extracellular vesicles as a possible mechanism of left-right symmetry-breaking in vertebrate development. *J. Theor. Biol.* 460, 220–226.
- Song, H., Hu, J., Chen, W., Elliott, G., Andre, P., Gao, B., and Yang, Y. (2010). Planar cell polarity breaks the bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. *Nature* 466, 378–382.
- Sorokin, S. (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 15, 363–377.

- Spemann, H., and Mangold, H. (1924). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int. J. Dev. Biol.* *45*, 13–38.
- Sulik, K., Dehart, D.B., Iangaki, T., Carson, J.L., Vrablic, T., Gesteland, K., and Schoenwolf, G.C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *201*, 260–278.
- Summers, K.E., and Gibbons, I.R. (1971). Adenosine Triphosphate-Induced Sliding of Tubules in Trypsin-Treated Flagella of Sea-Urchin Sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 3092–3096.
- Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S., and Brueckner, M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice. *Nature* *389*, 963–966.
- Supp, D.M., Brueckner, M., Kuehn, M.R., Witte, D.P., Lowe, L.A., McGrath, J., Corrales, J., and Potter, S.S. (1999). Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 5495–5504.
- Tabin, C.J., and Vogan, K.J. (2003). A two-cilia model for vertebrate left-right axis specification. *Genes Dev.* *17*, 1–6.
- Takada, S., and Kamiya, R. (1994). Functional reconstitution of *Chlamydomonas* outer dynein arms from alpha- beta and gamma subunits: requirement of a third factor. *J. Cell Biol.* *126*, 737–745.
- Takao, D., Nemoto, T., Abe, T., Kiyonari, H., Kajiura-Kobayashi, H., Shiratori, H., and Nonaka, S. (2013). Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation. *Dev. Biol.* *376*, 23–30.
- Takeda, S., Yonekawa, Y., Tanaka, Y., Okada, Y., Nonaka, S., and Hirokawa, N. (1999). Left-Right Asymmetry and Kinesin Superfamily Protein KIF3A: New Insights in Determination of Laterality and Mesoderm Induction by *kif3A*<sup>-/-</sup> Mice Analysis. *J. Cell Biol.* *145*, 825–836.
- Tanaka, C., Sakuma, R., Nakamura, T., Hamada, H., and Saijoh, Y. (2007). Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1. *Genes Dev.* *21*, 3272–3282.
- Tanaka, Y., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* *435*, 172–177.
- The International Polycystic Kidney Disease Consortium (1995). Polycystic kidney disease: The complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell* *81*, 289–298.
- Tsang, M., Lijam, N., Yang, Y., Beier, D.R., Wynshaw-Boris, A., and Sussman, D.J. (1996). Isolation and characterization of mouse Dishevelled-3. *Dev. Dyn.* *207*, 253–262.
- Vale, R.D., Reese, T.S., and Sheetz, M.P. (1985a). Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility. *Cell* *42*, 39–50.
- Vale, R.D., Schnapp, B.J., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T.S., and Sheetz, M.P. (1985b). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell* *43*, 623–632.
- Viotti, M., Niu, L., Shi, S.-H., and Hadjantonakis, A.-K. (2012). Role of the Gut Endoderm in Relaying Left-Right Patterning in Mice. *PLoS Biol.* *10* (3), e1001276

- Watanabe, D., Saijoh, Y., Nonaka, S., Sasaki, G., Ikawa, Y., Yokoyama, T., and Hamada, H. (2003). The left-right determinant *Inversin* is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Development* *130*, 1725–1734.
- Yamanaka, Y., Tamplin, O.J., Beckers, A., Gossler, A., and Rossant, J. (2007). Live Imaging and Genetic Analysis of Mouse Notochord Formation Reveals Regional Morphogenetic Mechanisms. *Dev. Cell* *13*, 884–896.
- Yeo, C.-Y., and Whitman, M. (2001). Nodal Signals to Smads through Cripto-Dependent and Cripto-Independent Mechanisms. *Mol. Cell* *7*, 949–957.
- Yokoyama, T., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Montgomery, C.A., Elder, F.F.B., and Overbeek, P.A. (1993). Reversal of Left-Right Asymmetry: A Situs Inversus Mutation. *Science* *260*, 679–682.
- Yokoyama, T., Harrison, W.R., Elder, F.F.B. & Overbeek, P.A., (1995). Molecular analysis of the *inv* insertional mutation. *Developmental Mechanisms of Heart Disease* \*
- Yoshihara, S., Shiratori, H., Kuo, I.Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, J.A., Sasaki, H., et al. (2012). Cilia at the Node of Mouse Embryos Sense Fluid Flow for Left-Right Determination via *Pkd2*. *Science* *338*, 226–231.
- Yoshioka, H., Meno, C., Koshihara, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E.V., Murray, J.C., et al. (1998). *Pitx2*, a Bicoid-Type Homeobox Gene, Is Involved in a Lefty-Signaling Pathway in Determination of Left-Right Asymmetry. *Cell* *94*, 299–305.
- Yuasa, T., Venugopal, B., Weremowicz, S., Morton, C.C., Guo, L., and Zhou, J. (2002). The Sequence, Expression, and Chromosomal Localization of a Novel Polycystic Kidney Disease 1-Like Gene, *PKD1L1*, in Human. *Genomics* *79*, 376–386.
- Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L., and Kuehn, M.R. (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* *361*, 543–547.

\* Originální citace převzatá ze sekundárního zdroje.