

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: zoologie



Bc. Tomáš Suchánek

Migrace a skeletogeneze trupové neurální lišty bazálních ryb

Migration and possible skeletogenesis of the trunk neural crest cells
in basal fishes

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Robert Černý, Ph.D.

Praha, L.P. 2021

Prohlášení

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

V Praze dne 5. srpna 2021

Tomáš Suchánek

Poděkování

Předložená diplomová práce by nevznikla bez zásluhy mnoha dalších lidí, jimž bych zde chtěl vyjádřit svůj vděk. V první řadě Robertovi za plodné rady a postřehy, neutuchající ochotu k debatě a vhléd do současné vědy. Dále kolegům a spolupracovníkům Honzovi, Ann, Aničce, Agátě, Vládovi, Štěpánce, Dominice, Wojtovi, Karlovi a Slavkovi za rady, technickou pomoc a zpětnou vazbu. Díky patří také přítelkyni, rodině a přátelům za podporu a pochopení.

Abstrakt

Neurální lišta je embryonální buněčná populace obratlovců vznikající během neurulace. Buňky neurální lišty jsou význačné zejména svou vysokou migrační schopností a také širokým diferenciačním potenciálem. V rámci neurální lišty bývají rozlišovány dvě hlavní subpopulace, lišící se zejména svou pozicí vzniku a utvářenými deriváty. Hlavová neurální lišta vznikající v hlavě, kde její buňky tvoří neurony, glie, pigmentové buňky a také ekto-mezenchymální deriváty: chrupavku a kost; a trupová neurální lišta vznikající posteriorně od hlavové, kde její buňky tvoří neurony, glie i pigmentové buňky, navíc také chromafinní buňky dřeně nadledvin. Dlouhá léta se myslelo, že buňky neurální lišty v trupu tvoří ekto-mezenchymální deriváty stejně jako v hlavě. Nyní se však ukazuje, že tato schopnost je v rámci trupu značně omezená. V této diplomové práci přináším první poznatky o buňkách trupové neurální lišty u zástupců bazálních skupin paprskoploutvých ryb (Actinopterygii), jmenovitě u bichira senegalského (*Polypterus senegalus*), jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a kostlína mexického (*Atractosteus tropicus*). Podrobně je v práci popsána doba a místo vzniku buněk trupové neurální lišty, jejich místo v rámci neuroektodermu při zahájení migrace, cesty migrace, závislost migrace buněk trupové neurální lišty na úrovni diferenciace somitů, segmentace při ventro-mediální migraci a v neposlední řadě raná diferenciace těchto buněk. Poprvé jsou zde prezentovány také deriváty trupové neurální lišty bichira z experimentálního značení pomocí barviva CM-DiI.

Klíčová slova: trupová neurální lišta, cesty migrace, exoskelet, bazální paprskoploutvé ryby

Abstract

The neural crest is a vertebrate-specific embryonic cell population emerging during neurulation in a neuroectoderm. Its cells are highly migratory and differentiate into a wide scale of cell types and tissues ranging from skeletal tissues through pigment cells to neurons and endocrine gland. The neural crest research had been focused on a cranial subpopulation for a long time probably due its apparent skeletogenic activity rather than in the trunk. In this diploma thesis and for a first time I present a data about trunk neural crest cells of basal fishes, Senegal bichir (*Polypterus senegalus*), sterlet (*Acipenser ruthenus*) and tropical gar (*Atractosteus tropicus*). It contains a data about spatio-temporal emergence of trunk neural crest cells of basal fishes, their site of delamination from neuroectoderm, pathways of migration, link between their migration and somite development, segmentation during ventro-medial migration and their early differentiation. Herein I also bring out as first an insight on the trunk neural crest derivatives of the Senegal bichir from *in vivo* staining experiments using CM-DiI.

Key words: trunk neural crest, migratory pathways, exoskeleton, basal ray-finned fishes

Obsah

1	Teoretický úvod	1
1.1	Evoluční vznik neurální lišty	2
1.2	Rozdíly v neurální liště: hlava a trup	2
1.3	Migrace a diferenciacce buněk trupové neurální lišty	4
1.3.1	Svaloploutví (Sarcopterygii)	5
1.3.2	Paprskoploutví (Actinopterygii)	6
1.4	Skeletogeneze	7
1.4.1	Skelet a jeho evoluce	8
1.4.2	Příspěvek neurální lišty do exoskeletu současných obratlovců	9
1.4.3	Ganoidní šupina bichira	10
2	Materiál a metody	11
2.1	Fixace & postfixace	11
2.2	Histochemie	11
2.3	Imunohistochemie	12
2.3.1	Celkovostní barvení	12
2.3.2	JB-4 řezy	12
2.3.3	Agarové řezy	13
2.3.4	Použité protilátky	13
2.4	Injikace a odchov	13
2.5	Zpracování dat	13
3	Výsledky	15
3.1	Vznik buněk trupové neurální lišty	15
3.1.1	Celkovostní vizualizace místa a dynamiky vzniku bTNL	15
3.2	Analýza lokace bTNL v rámci neuroektodermu a místa jejich delaminace	16
3.2.1	Přítomnost bTNL v rámci neuroektodermu	16
3.2.2	Anatomie neuroektodermu a místo delaminace bTNL	17
3.3	Analýza konkrétních cest migrace bTNL	18
3.3.1	Bichir senegalský	18
3.3.2	Jeseter malý	19
3.3.3	Kostlín mexický	20
3.4	Analýza vztahu mezi migrací bTNL a somity	21
3.5	Analýza závislosti segmentální migrace na dorzo-ventrální úrovni	21
3.6	Experimentální značení buněk trupové neurální lišty bichira	22
4	Tabule	24
5	Diskuze	53
5.1	Neurulace a delaminace buněk trupové neurální lišty	53
5.2	Migrace buněk trupové neurální lišty	54

5.3	Deriváty trupové neurální lišty	55
6	Závěr	57
7	Literatura	58

1. Teoretický úvod

Neurální lišta je multipotentí embryonální buněčná populace specifická pro obratlovce. Zakládá se během neurulace jako součást neuroektodermu. V průběhu vývoje jedince buňky neurální lišty prodělávají epitelio-mezenchimální přeměnu, a vymaňují se (delaminují) z epiteliálního uskupení neuroektodermu. Ve formě volného mezenchymu poté migrují po komponentách mimobuněčné hmoty vyvíjejícího se jedince na konečné místo, kde diferencují [1, 2]. Kvůli široké škále derivátů, kterým neurální lišta dává vzniknout, bývá označována za čtvrtou zárodečnou vrstvu [3]. Tvoří na 37 jedinečných buněčných typů (např. odontoblasty, Schwannovy buňky, melanocyty či neurony enterického systému), a 10 jich sdílí společně s mezodermem (kupř. fibroblasty, osteocyty, chondrocyty) [4]. Až na malé procento jsou jednotlivé buňky neurální lišty během delaminace a časné migrace multipotentní, jinými slovy, jejich buněčný osud není předurčen [5]. Ještě před samotnou delaminací nejspíše dochází k obnově pluripotence, a buňky neurální lišty tak nabývají vlastností buněk jiných zárodečných vrstev [6]. Následně během migrace se vývojový potenciál omezuje odštěpováním jednotlivých buněčných linií [7].

Všechny procesy týkající se neurální lišty od její indukce v neuroektodermu, přes delaminaci a migraci jejích buněk až po diferenciaci řídí tzv. genová regulační síť. Buňky neurální lišty vlivem signálních drah a transkripčních faktorů této sítě nabývají potřebných vlastností, např. schopnost migrace či diferenciaci v kýžený derivát [8]. Transkripční faktory uplatňující se během delaminace jsou např. *FoxD3* či *Snai*, během migrace zejména *Sox10*, a při diferenciaci např. *Mitf*, *Sox9* a také *Sox10* [9]. Defekty vznikající v genové regulační síti neurální lišty vedou k vrozeným vadám, tzv. neurokristopatiím. U člověka se projevují více než padesáti chorobami, postihující kraniofaciální oblast, kůži, endokrinní, imunní, srdeční a gastrointestinální systém [10]. Podle dané choroby lze odvodit, která subpopulace neurální lišty (více v kapitole 1.2) je původcem malformace, čímž může být léčba lépe cílena [11]. Výzkum neurální lišty má tak vysoký význam i pro medicínské užití.

Z evolučního hlediska je vznik neurální lišty význačnou událostí doprovázející vznik obratlovců jako takových. Společně s ektodermálními plakodami je neurální lišta odpovědná za vznik tzv. nové hlavy obratlovců (nadstavbou původní hlavy strunatců), což mimo jiné umožnilo přechod od filtračního způsobu získávání potravy k aktivní predaci, a tím pádem i diverzifikaci celé skupiny [12]. Přestavba na obratlovčí bauplan byla doprovázena postupným obohacováním genové regulační sítě vznikající neurální lišty za přispění celogenomové duplikace [13].

1.1 Evoluční vznik neurální lišty

U kopinatce (Cephalochordata) se v nervové trubici vyskytují pigmentové buňky podobné svým genovým profilem pigmentovým buňkám obratlovců, mající původ v neurální liště. Na rozdíl od nich však nemigrují, a nervovou trubici vůbec neopouští [14]. Tyto buňky odpovědné za fotorecepci a pigmentaci mohou představovat buněčný předstupeň samotné neurální lišty [15].

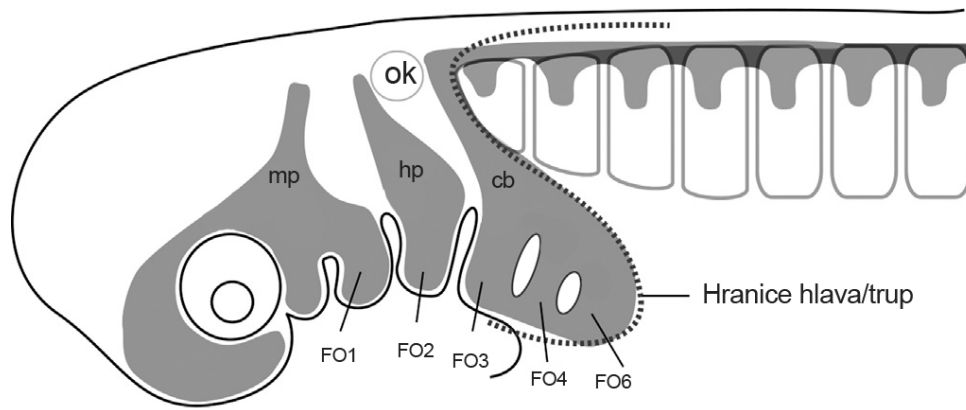
Pláštěnci (Tunicata) oproti kopinatci představují nejbližší příbuzné obratlovců [16]. U pláštěnky *Ecteinascidia turbinata* byly objeveny buňky migrující z nervové trubice, nadto diferencující převážně v buňky pigmentové, což poukazuje na podobnost s buňkami neurální lišty [17]. U jiného zástupce, sumky trubičkové (*Ciona intestinalis*), se v oblasti hlavy vyskytují také buňky s charakteristikami neurální lišty obratlovců, jednak svou pozicí vzniku na hranici neurálního ektodermu, a jednak podobnými geny pro specifikaci. Nicméně tyto buňky postrádají migrační schopnost [18]. Situace se však liší v oblasti trupu, kde z nervové trubice delaminující buňky migrují a později diferencující v bipolární neurony, jež propojují sensorické neurony s motorickým gangliem či mozkiem. Místem vzniku, genovým profilem, migračním chováním, funkcí a i samotnou morfologií odpovídají spinálním gangliím obratlovců, jež vznikají právě z buněk neurální lišty trupu. Tyto buňky tedy mohou být homologické buňkám neurální lišty obratlovců [19].

Okraj neuroektodermu prvoústých a druhoústých živočichů má společné rysy v genové expresi i skladbě derivátů. U obratlovců se tato oblast (nazývaná okraj neurální ploténky) dále regionalizuje na plakodální oblast a neurální lištu [20]. K tomuto rozdělení okraje neuroektodermu patrně došlo již u společného předka pláštěnců a obratlovců [21]. Buňky proto-neurální lišty zřejmě disponovaly migrační schopností a měly některé vlastnosti neurální lišty [18]. Znaky charakterizující neurální lištu *per se* však byly postupně inkorporovány až kmenovými skupinami obratlovců, kdy došlo k zavzetí klíčových genů do genové regulační sítě neurální lišty [22]. Změny v regulaci neurální lišty nastaly poté mezi kruhoústými (Cyclostomata) a čelistnatci (Gnathostomata). Třebaže je jádro genové regulační sítě pro neurální lištu shodné pro všechny obratlovce, mezi kruhoústými a čelistnatci existují rozdíly v regulaci jejího programu [23].

1.2 Rozdíly v neurální liště: hlava a trup

Buňky neurální lišty vznikají po celé antero-posteriorní ose embrya. Vedle genového profilu se liší také jejich migrační chování a diferenciační schopnosti podle toho, v jakém místě po této ose vznikají [24].

V hlavě buňky neurální lišty delaminují v jeden okamžik, a dále migrují jako masivní shluk ve třech hlavních proudcích (mandibulárním, hyoidním a branchiálním) až do faryngeálních oblouků [25, 26, 27, 28]. Uskupení buněk do podoby proudců je dáno mnoha faktory. Jednak vnitřními, jako je aktivita hox-genů, a jednak faktory vnějšího prostředí, jakými jsou signály z endodermu a ektodermu, či také interakce s buňkami mezodermu [26, 29, 30]. Ačkoli je hlavní migrační schéma konzervativní pro všechny obrat-

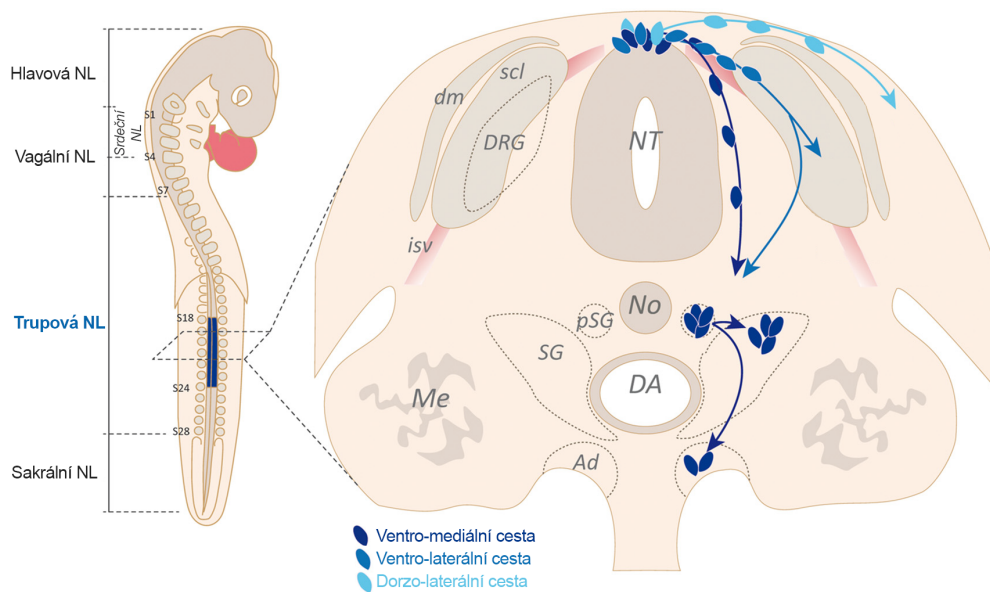


Obrázek 1: Rozdíly ve způsobu migrace buněk neurální lišty s vyznačenou hranicí mezi hlavou a trupem na zobecněném embryu obratlovce. Zkratky: cb – cirkum-faryngeální buňky vagální neurální lišty; hp – hyodní proud; ok – očíká kapsula; FO – faryngeální oblouk; mp – mandibulární proud. Upraveno podle Kuratani & spol. (2018) [35].

lovce, mezi jednotlivými druhy se mohou vyskytovat heterochronie v migraci jednotlivých proudů, jež jsou poté příčinou vzniku morfologických odlišností [31]. Buňky hlavové neurální lišty diferencují v ganglia hlavových nervů, svalovinu či melanocyty, ale také tvoří skeletální tkáň: kost, chrupavku a vazivo, čímž se odlišují od buněk neurální lišty v trupu, jež tyto tkáňe tvoří [28, 32].

Buňky neurální lišty v trupu delaminují na rozdíl od těch v hlavě postupně v rostro-kaudálním rázu a v menším počtu [25]. Jednotlivé proudy nejsou masivní tak jako v hlavě, nýbrž tvoří úzké „řetízky“. Směr migrace jednoho řetízku řídí vedoucí buňka polarizovaná ve směru migrace, jež vede za sebou následující buňky, samostatně neschopné orientované migrace [33]. Deriváty buněk trupové neurální lišty jsou spinální ganglia, sympatická ganglia, Schwannovy buňky, chromafinní buňky či buňky pigmentové [34].

Odlišnost ve způsobu migrace mezi buňkami hlavové a trupové neurální lišty se odráží od prostředí, ve kterém se vykytují. Zatímco v hlavě je hlavní schéma migrace stanoveno faryngeálním aparátem, v trupu jsou to zejména somity, jež ovlivňují formu migrace. Hranice mezi těmito dvěma oblastmi leží za očíká kapsulí, a tvoří ji předěl faryngeálního aparátu hlavy s prvním somitem v trupu (viz obrázek 1). Tato hranice nabývá tvaru písmene „S“ na sagitálním řezu jedincem [35]. Vedle hlavové a trupové neurální lišty se rozlišují ještě další dvě subpopulace: vagální a sakrální. Vagální neurální lišta se nachází mezi hlavovou a trupem, a dává vznik cirkum-faryngeálním buňkám, jež přispívají do tvorby enterického nervového systému, kardiovaskulárního systému, brzlíku, a také ganglií plic a slinivky břišní [36, 37]. Sakrální neurální lišta se vyskytuje pouze u blanatých obratlovců, a rozkládá se za trupovou oblastí. Její buňky se podílí na tvorbě enterického nervového systému střeva [24]. Vývojovou schopnost daných subpopulací se však podařilo uměle „přeprogramovat“ na jinou [38, 39].



Obrázek 2: Schématický nákres subpopulací neurální lišty po antero-posteriorní ose (vlevo) a cest migrace s místy diferenciace buněk trupové neurální lišty (vpravo). Zkratky: ad – dřeň nadledvin; da – dorzální aorta; dm – dermomyotom; drg – spinální ganglion; isv – mezisomitická céva; me – mezonefros; nt – nervová trubice; no – notochord; psg – primární sympatické ganglion; scl – sklerotom; sg – sympatické ganglion. Upraveno podle Delloye-Bourgeois & Castellani (2019) [41].

1.3 Migrace a diferenciace buněk trupové neurální lišty

Aby mohly buňky trupové neurální lišty migrovat a dát tak vzniknou požadovaným buněčným typům a tkáním na různých místech vyvíjejícího se jedince, musí se nejprve zbavit své epiteliální formace a delaminovat z neuroektodermu. Tato delaminace se odehrává v návaznosti na rozpad epiteliálních somitů [40]. Po delaminaci buňky trupové neurální lišty zahajují migraci, jež může vést třemi hlavními cestami: nejčasnější **ventro-mediální** cestou vedoucí mezi nervovou trubicí s notochordem a somity; **ventro-laterální** cestou skrze anteriorní polovinu sklerotomů, ale jen u některých skupin obratlovců; a pozdější **dorzo-laterální** cestou, vedoucí mezi ektodermem a somity [34, 41]. To, jakou cestou buňky trupové neurální lišty migrují, má také vliv na výsledný derivát. Buňky migrující ventro-mediální cestou diferencují v neurony a glie sympatických ganglií a v chromafinní buňky dřeně nadledvin, zatímco buňky migrující ventro-laterální cestou tvoří spinální ganglia, neurony a Schwannovy buňky předních kořenů míšních. Buňky migrující dorzo-laterální cestou diferencují v buňky pigmentové [41, 42]. Buňky trupové neurální lišty jsou při své migraci ovlivňovány okolními tkáněmi, zvláště poté buňkami somitů, a tím také dochází ke zpřístupnění jednotlivých migračních cest [43]. Dokáží však také komunikovat mezi sebou, a např. fyzický kontakt jim dopomáhá v orientaci během migrace [44]. Vedle toho, buňky trupové neurální lišty mají také vliv na své okolí, a podílí se např. na dozrávání myotomů [45].

Data o trupové neurální liště pochází převážně ze studií provedených na modelových druzích. Z toho důvodu jsou dále uvedeny informace o cestách migrace buněk trupové neurální lišty a jejich derivátech zejména u těchto druhů. Pro přehlednost byly rozděleny

do dvou skupin: svaloploutví a paprskoploutví. Zástupce svaloploutvé linie obratlovců tvoří myš domácí, kur domácí a axolotl mexický, zástupce paprskoploutvé linie obratlovců poté danio pruhované, jež je také svou fylogenetickou pozicí bližší zde studovaným druhům bazálních (bazálně se odštěpující) paprskoploutvých ryb, a proto je rozebráno podrobněji než zástupci svaloploutvé linie.

1.3.1 Svaloploutví (*Sarcopterygii*)

Myš domácí (*Mus musculus*)

Delaminace buněk trupové neurální lišty u myši (*Mus musculus*) nastává po splynutí neurálních valů v nervovou trubici, na rozdíl od hlavy, kde delaminují ve fázi stále otevřených neurálních valů [46]. Po delaminaci zahajují buňky migraci, a to jak dorzo-laterální, tak i ventrální cestou, kterou navíc buňky putují ve dvou fázích. V první fázi migrují ventro-laterálně anteriorní polovinou sklerotomů až k oblasti dorzální aorty, kde diferencují v sympatické neurony. V průběhu této migrace tvoří buňky segmentálně uspořádané proudy po antero-posteriorní ose. Ve druhé fázi pronikají buňky trupové neurální lišty do sklerotomů, kde kondenzují ve spinální ganglia [47].

Deriváty buněk neurální lišty trupu myši jsou neurony a glie spinálních a sympatických ganglií, Schwannovy buňky, chromafinní buňky, a konečně také pigmentové buňky [48].

Kur domácí (*Gallus gallus*)

Stejně jako u jiných probíhá delaminace buněk trupové neurální lišty kuřete (*Gallus gallus*) v antero-posteriorním rázu. První buňky opouští nervovou trubici na dorzální straně a následně vstupují na ventro-mediální cestu migrace vedoucí mezi dermomatomytem a nervovou trubicí. Některé buňky zůstávají v blízkosti nervové trubice, v místě budoucích spinálních ganglií, ostatní buňky migrují ventrálně k dorzální aortě [49]. V čase rozpadu a zrání somitů vstupují buňky do rozvolněných sklerotomů, a dále migrují pouze jejich anteriorní polovinou, což vede k segmentaci migrace po antero-posteriorní ose [50, 51]. V posteriorní oblasti sklerotomů buňky neurální lišty migrují mezi nervovou trubicí a samotným sklerotomem. Okolí notochordu je prosté buněk neurální lišty, pravděpodobně kvůli migraci pouze skrze sklerotomy a nikoli mimobuněčným prostorem mezi sklerotomem a notochordem [50]. V dalších fázích vývoje dochází postupně ke zvyšování počtu delaminujících buněk a posléze počínají buňky neurální lišty vstupovat také na dorzo-laterální cestu [49]. Migrují jednotlivě s velkými vzdálenostmi mezi sebou [50], zatímco buňky migrující ventrální cestou, tvoří tzv. řetízky [49].

Buňky trupové neurální lišty kuřete tvoří spinální a sympatická ganglia, ventrální axony nervové trubice [52, 53], melanocyty a chromafinní buňky [53].

Axolotl mexický (*Ambystoma mexicanum*)

Po delaminaci se buňky trupové neurální lišty axolotla mexického (*Ambystoma mexicanum*) nejprve seskupují nad nervovou trubicí, kde tvoří vícevrstevnou „strunu“, a posléze zahajují svoji migrační fázi v antero-posteriorním rázu [54, 55]. Během migrace poté buňky trupové neurální lišty vstupují nejprve na dorzo-laterální cestu na rozdíl od většiny ostatních zástupců svaloploutvé linie obratlovců. Později buňky trupové neurální lišty migrují ventro-mediální cestou, ačkoli ve výrazně menším počtu. V pozdějších stádiích se buňky migrující dorzo-laterální cestou usazují a diferencují v pigmentové buňky. Zatímco migrace dorzo-laterální cestou v tento okamžik probíhá už jen v malé míře, ventromediální cestou migruje velké množství buněk. Buňky neurální lišty také migrují do hřbetní ploutve [55]. Mezi deriváty jsou spinální ganglia, chromafinní buňky, sympatické neurony a pigmentové buňky, a to jak melanofory tak xantofory. Buňky neurální lišty z nejrostrálnější části trupu formují také glie, jež jsou ve spojení s neurony postranní čáry [55]. Společně s mezodermem se měly buňky neurální lišty trupu podílet na tvorbě mezenchymu hřbetní ploutve [55, 56], nicméně v následné studii se ukázalo, že tento mezenchym je odvozen výhradně z mezodermy [57].

Jiné druhy svaloploutvých

Migrace buněk trupové neurální lišty byla zkoumána také u dalších zástupců svaloploutvé linie, ačkoli s menší mírou než u modelových druhů. U člověka (*Homo sapiens*), chameleona jemenského (*Chamaeleo calyptratus*), nebo korálovky kalifornské (*Lampropeltis californiae*) migrují buňky trupové neurální lišty nejprve ventro-mediální, a později dorzo-laterální cestou [58, 59, 60]. U korálovky byly migrující buňky pozorovány také v oblasti myosept. U želvy nádherné (*Trachemys scripta*) byla pozorována tzv. druhá vlna buněk trupové neurální lišty vznikající v době, kdy již jsou vytvořena spinální ganglia i faryngální aparát [61]. Tyto buňky migrují do mezenchymu karapaxu, a posléze dorzo-laterálně až do oblasti plastronu, kde se zřejmě podílí na jeho tvorbě.

1.3.2 Paprskoploutví (Actinopterygii)**Danio pruhované (*Danio rerio*)**

U dania pruhovaného (*Danio rerio*) vznikají buňky trupové neurální lišty nejen v okraji neurální ploténky, ale také v ocasním pupenu z progenitorových buněk neuromezodermy [62]. Delaminace a následná migrace probíhá v rostro-kaudálním rázu. Z laterálních stran nervové trubice migruje první skupina buněk, jež vstupuje na ventro-mediální cestu migrace. Jednotlivé buňky se s uraženou vzdáleností sbíhají ke středu somitů, a v úrovni styku nervové trubice s notochordem jsou již segmentálně uspořádány v antero-posteriorní ose. Druhá migrační vlna nastává později z nejdorzálnějšího vrcholu nervové trubice. Většina těchto buněk vstupuje na dorzo-laterální cestu, ostatní migrují cestou ventro-mediální [63].

Na rozdíl od kuřete a myši, kde se po mediální straně somitu rozkládá sklerotom, u dania je to myotom, jež navíc tvoří většinu somitu. Sklerotom tvoří pouze malou část

uloženou ventro-mediálně pod myotomem [64, 65]. Nicméně, i přes nepřítomnost sklerotomu na mediální straně dochází k segmentální migraci buněk neurální lišty, a to již v úrovni ventrálního okraje nervové trubice, jak již bylo zmíněno výše [63]. Příčinou mohou být myotomální buňky pomalého svalstva, které předem definují segmentální cestu pro buňky neurální lišty v průběhu vlastní migrace z mediální strany skrze somit, až na jeho laterální okraj [66]. Myotom tak může představovat jeden ze signalizačních zdrojů pro segmentální migraci buněk neurální lišty, včetně obratlovců svaloploutvé linie [67]. Nicméně, exprese sklerotomálních genů odhalila, že se u dania vedle ventro-mediálně uloženého sklerotomu vyskytuje i druhý kompartment, umístěný laterálně od nervové trubice v rámci somitu [68]. Buňky neurální lišty tak mohou již na počátku své migrace interagovat se sklerotomem, jež by udával těmto buňkám segmentální vzor migrace.

Z neurálních derivátů trupové neurální lišty se nejdříve zakládají spinální ganglia ventro-laterálně od nervové trubice, a později sympatická ganglia laterálně od dorzální aorty [69]. V nejanteriornější části trupu ventrálně od sympatických neuronů diferencují buňky neurální lišty zřejmě v chromafinní buňky [69]. Dalším z derivátů buněk neurální lišty jsou pigmentové buňky, které u dania nabývají jednoho ze tří možných typů: černé melanofory, žluté xantofory či stříbřité iridofory [70]. Dalšími deriváty neurální lišty v trupu dania jsou senzorycké neurony a Schwannovy buňky [63], či gliové buňky neuroblastů postranní linie [71]. Buňky trupové neurální lišty se měly podílet také na tvorbě mezenchymu ploutevního lemu dánie [72], což se později ukázalo jako neplatné, a zdroj tohoto mezenchymu tak představuje výhradně mezoderm [73]. U medaky japonské (*Oryzias latipes*), jež je blízce příbuzná danii, byly buňky trupové neurální lišty pozorovány také ve vyvíjejících se nepárových ploutvích. V hřbetní, ocasní a ani řitní ploutvi však tyto buňky nediferencovaly v osteoblasty, jež tvoří kostěné paprsky ploutví. Jak se ukázalo, tyto paprsky vznikají výhradně z mezodermy [74]. K přítomnosti buněk trupové neurální lišty se však vyjadřují autoři studie provedené na jiném zástupci paprskoploutvých ryb, a to platýsovců (*Paralichthys olivaceus*) [75, 76]. Tvrdí, že tyto buňky využívají prostoru hřbetní ploutve jako dočasné útočiště, aby mohly v pozdějších stádiích vývoje dále migrovat a diferencovat v adultní typ pigmentových buněk.

1.4 Skeletogeneze

Buňky hlavové neurální lišty se podílí na tvorbě lebky utvářením skeletálních tkání: chrupavky a kosti a zuboviny [77, 78]. Z výsledků klasických transplantačních experimentů se však soudilo, že buňky trupové neurální lišty tento potenciál tvořit skelet nemají [79]. Experimenty v *in vitro* podmínkách však odhalily, že za vhodných podmínek vnějšího prostředí mohou buňky trupové neurální lišty tvořit skeletální tkáň, a to jak chrupavku, tak i kost [80, 81]. K tvorbě chrupavky může dokonce dojít za *in vivo* podmínek po vnesení genového regulačního programu buněk hlavové oblasti neurální lišty do oblasti trupu [38]. Jak vyplývá z výsledků studie provedené na myši, potenciál buněk hlavové neurální lišty tvořit ektomezenchymální deriváty, a tedy i skeletální tkáň, je zřejmě stanoven až v prů-

běhu delaminace. Do zahájení delaminace tak buňky neurální lišty všech oblastí sdílí stejný diferenciační potenciál [7].

1.4.1 Skelet a jeho evoluce

Ač lze skelet obratlovců dělit podle několika kritérií, dvěma hlavními skeletálními systémy jsou endoskelet a exoskelet, odlišené zejména svou pozicí [82, 83]. Endoskelet se vyvíjí uvnitř těla jedince a je primárně tvořen chrupavkou, jež může být dále nahrazena kostí, naproti tomu exoskelet se vyvíjí v blízkosti povrchu jedince, a může se skládat v různém poměru z kosti, zuboviny a skloviny [84]. V průběhu evoluce však mohlo dojít k posunu těchto skeletálních systémů dovnitř či vně. Příkladem je karapax želv, který představuje tzv. vnější endoskelet, či klíční kost savců jakožto vnitřní exoskelet [82]. Nutno podotknout, že dělení na endoskelet či exoskelet nemá co do činění s vývojovým původem v zárodečných vrstvách, a oba typy skeletálního systému mohou být tvořeny jak mezodermem, tak neurální lištou [84].

Prvním skeletogenním projevem v evoluci obratlovců je nemineralizovaná chrupavka časných obratlovců vázaná na hltan jakožto součást endoskeletu [83]. Mineralizovaný skelet se posléze objevuje náhle v rámci mimořádně rozvinutého exoskeletu u několika skupin bazálních čelistnatců. Tento exoskelet je tvořen buďto jednotlivými šupinami pokrývajícími celý povrch těla, podobně jako je tomu u současných žraloků, nebo tyto šupiny pokrývají pouze trupovou oblast a ocas, zatímco hlavu a malou část trupu kryje několik plátů, častokrát srůstajících v hlavové pouzdro [83]. Jednotka tohoto exoskeletu sestává z odontogenní komponenty podobné zubu na povrchu, a osteogenní komponenty tvořené kostí na bázi [85, 86]. Vznik exoskeletu mohl být dán tvorbou odontogenních tkání za účelem ochrany odontoblastů, jež jsou citlivé na mechanické, teplotní a osmotické změny, a jejichž původní funkcí tak mohl být mechano-senzorický přenos signálů z vnějšího prostředí [20, 87]. Všechn exoskelet evolučně mladších obratlovců je pravděpodobně odvozen z tohoto exoskeletu bazálních bezčelistnatců [86]. Na základě tkáňové stavby se jeví pravděpodobné, že by alespoň některé komponenty tohoto exoskeletu mohly být odvozeny od neurální lišty, neboť přítomná zubovina je tvořena odontoblasty, které vždy vznikají z buněk neurální lišty [86, 88].

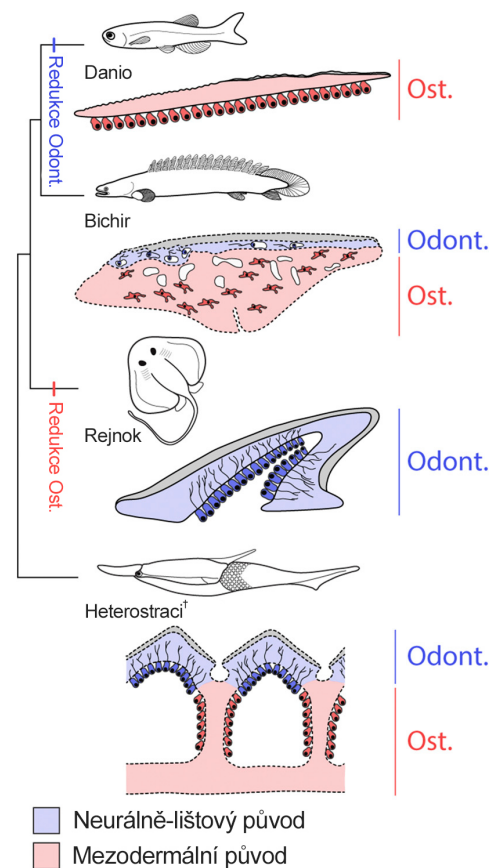
Současně nám známý endoskelet obratlovců zahrnující mineralizované neurokranium, viscerokranium, axiální skelet a skelet končetin se objevil až se vznikem čelistnatců [83]. Ti se během krátkého časového úseku rozdělili na paryby (Chondrichthyes) a kostnaté ryby (Osteichthyes), a exoskelet se od této chvíle začal redukovat. U paryb se z exoskeletu redukovala osteogenní část, kdežto odontogenní část zůstala zachována. U raných kostnatých ryb došlo ke splynutí jednotlivých šupin v tzv. odontokomplex za vzniku rhombické šupiny, tvořené jak odontogenní, tak osteogenní částí. Odontokomplex zůstal v současnosti zachován u bazálních lalokoploutvých ryb (Coelacanthiformes) v podobě kosmoidní šupiny, a bazálních skupin paprskoploutvých ryb (Polypteridae a Lepisosteidae) v podobě šupiny ganoidní [85]. Redukcí jak osteogenní, tak i odontogenní vrstvy vznikla šupina elasmoidní, a to procesem pedomorfózy buďto přímo z rhombické, či z ga-

noidní šupiny [89]. Dnes se jedná o nejrozšířenější typ exoskeletu mezi obratlovci, přítomný u cca 26000 kostnatých (Teleostei), ne-tetrapodních lalokoploutvých a některých červorů (Gymnophiona) [86]. U současných čtyřnožců (Tetrapoda) sestává exoskelet pouze z osteogenní části, vyjma např. některých červorů [90].

1.4.2 Příspěvek neurální lišty do exoskeletu současných obratlovců

Nejbazálnější skupiny současně žijících obratlovců, jež jsou sliznatky a mihule, nemají svůj skelet mineralizovaný vůbec. Nejbazálnějšími současně žijícími obratlovci s mineralizovaným skeletem jsou poté zástupci paryb (Chondrichthyes) a bazálních skupin kostnatých ryb (Osteichthyes), jejichž stav skeletu je však v porovnání s výchozím stavem u vyhynulých bezčelistnatců redukován [91]. Trupový exoskelet současných paryb představují plakoidní šupiny, jež jsou tvořeny pouze odontogenní komponentou [86].

Sledováním buněčného osudu buněk trupové neurální lišty pomocí barviva CM-DiI u rejnoka bodlinatého (*Leucoraja erinacea*) se potvrdilo, že plakoidní šupiny tvořené odontogenní komponentou jsou odvozeny od trupové neurální lišty, a to navíc bez příspěvu mezodermy [92]. Avšak u současných zástupců kostnatých (Teleostei) se přítomnost buněk trupové neurální lišty na tvorbě exoskeletu nepotvrdila. Osteoblasty tvořící elasmoidní šupiny a ploutevní paprsky medaky japonské (*Oryzias latipes*) se ukázaly být odvozeny výlučně od mezodermy, a příspěvek trupové neurální lišty na jejich stavbě byl zavržen [74]. Stejně tak osteoblasty tvořící elasmoidní šupiny dania pruhoňaného (*Danio rerio*) se ukázaly být odvozeny výhradně od mezodermy [93, 94]. Ve svaloploutvé linii obratlovců, konkrétně u želvy nádherné (*Trachemys scripta*), však byly pozorovány pozdně migrující buňky trupové neurální lišty do oblasti zakládajícího se plastronu. Protilátkovým barvením v komparaci se sledováním buněčného osudu pomocí injekce barvivem DiI se ukázalo, že tyto buňky tvoří mezenchym zakládajícího se plastronu, který v *in vitro* kultuře navíc vykazuje skeletogenní aktivitu [61, 95]. U aligátorů jsou zakládající se gastralie obklopena buňkami pozitivními na HNK-1. Buňky trupové neurální lišty se tak mohou podílet také na tvorbě gastralí, jež jsou hodnoceny jako homologní třem posteriorním párovým kostem plastronu želv [96].



Obrázek 3: Schéma evoluce exoskeletu ve vztahu k embryonálnímu původu jednotlivých komponent u vybraných zástupců obratlovců. Vysvětlivky: Ost. – osteogenní komponenta; Odont. – odontogenní komponenta. Upraveno podle Gillis & spol. (2017) [92].

Ač se ukazuje, že buňky trupové neurální lišty mají potenci tvořit skelet také u současně žijících obratlovců, další ověření jsou na místě, ať už třeba kvůli nízkému počtu potvrzených případů v případě rejnoka, či analýzy pouze vznikajícího a nikoli vyvinutého plastronu v případě želvy. Vhodným modelem by tak mohli být bichiři, zástupci čeledi Polypteridae.

1.4.3 Ganoidní šupina bichira

Ganoidní šupina bichirů (Polypteriade) je v současnosti nejméně redukováným exoskeletem, jenž si zachovává většinu znaků rhombické šupiny raných kostnatých ryb (Osteichthyes). Ač prošla evolučními změnami, stále je tvořena povrchovou odontogenní i bazální osteogenní komponentou [85].

Povrch ganoidní šupiny bichira je vždy kryt pokožkou (tzv. ganoidní membránou), nikdy tudíž není šupina přímo vystavěna vnějšímu prostředí. Pod ganoidní membránou se nachází samotná šupina, apikálně tvořená ganoinem. Ganoin je složením totožný se sklovinou, v porovnání s ní je však vícevrstevný [97]. Pod ganoinem se nachází vrstva zuboviny, která je svou stavbou unikátní pro bichira, neboť nepřipomíná žádný jiný známý druh zuboviny. Její vrchní část tvoří tubulární celulární zubovina [86]. A právě v této vrstvě zuboviny ganoidní šupiny bichira předpokládáme přítomnost buněk trupové neurální lišty. Takový nález by podpořil tvrzení o skeletogenním potenciálu buněk trupové neurální lišty uplatňujícím se v *in vivo* podmínkách, i schéma evoluce exoskeletu obratlovců. Vedle bichirů se ganoidní šupinou vyznačují také kostlíni (Lepisosteidae), nicméně tato šupina má zubovinovou vrstvu zcela redukovanou [97]. Pod zubovinou se nachází vrstva elasmodinu, který je svým uspořádáním podobný dřevotřísece. U bichira však elasmodin netvoří většinu šupiny jako v případě elasmodinové šupiny, ale kontinuum mezi zubovinou uloženou apikálně a vaskularizovanou celulární kostí uloženou bazálně [89].

Bichir tak představuje klíčový druh pro pochopení evoluce obratlovčího exoskeletu, stejně jak pro pochopení evoluce neurální lišty vzhledem ke skeletogennímu potenciálu její trupové oblasti [13, 85, 92].

2. Materiál a metody

Embryonální materiál **bichira senegalského** (*Polypterus senegalus* Cuvier, 1829) byl zajištěn laboratoří školitele na katedře zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy ve spolupráci s akvaristy Vojtěchem Millerem, Mgr. Karlem Kodejšem a Slavomírem Dobrotkou. Jednotlivá stadia vývoje byla určena podle vývojové tabulky Diedhioua a Bartsche (2009) [98]. **Jeseter malý** (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) zaopatřila Fakulta rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, pod záštitou doc. Ing. Martina Pšeničky, Ph.D. Po převozu byla embrya následně odchovávána v provzdušňovaném medium E2, obohaceném o antibiotika penicilin a streptomycin [99]. Stadia určena dle Dettlaffa & spol. (1993) [100]. Embrya **kostlína mexického** (*Atractosteus tropicus* Gill 1863) byla získána Mgr. Robertem Černým, Ph.D. a Mgr. Martinem Minaříkem, Ph.D. od Lenina Arias Rodrigueza, Ph.D z mexické Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Stadia byla stanovena podle Longa a Ballarda (2001) [101].

2.1 Fixace & postfixace

Před samotnou fixací byl z povrchu embryí odstraněn nejsvrchnější vaječný obal za pomoci mikropinzet. Ta embrya, která byla ve stadia neuruly a starší, byla navíc anestetizována v roztoku MS-222 (Sigma). Fixace probíhala ve 4% roztoku paraformaldehydu v 0,1M fosfátovém pufru (PBS) po dobu 12-16 hodin při teplotě 4 °C. Zafixovaná embrya byla následně promývána po dobu 10 minut v PBS, z embryí jesetera byl navíc odstraněn i druhý, těsně přiléhající vaječný obal. Posléze byla embrya převedena do methanolu alkoholovou řadou po 25%, s časem promytí 10 minut v každé lázni. Embryonální materiál byl poté dlouhodobě skladován v methanolu při teplotě -20 °C.

2.2 Histochemie

V methanolu skladová embrya byla přendána do 99,6% ethanolu na 10 minut. Mezitím byl připraven JB-4 roztok A+C v poměru 0,0375 g JB-4 C na 3 ml JB-4 A, do kterého byla posléze embrya přenesena. Poté, co embrya klesla na dno nádoby s JB-4 roztokem A+C, byl roztok obměněn, a embrya ponechána 30 minut na laboratorní třepačce za pokojové teploty. Následně byl JB-4 roztok A+C opět obměněn, a embrya v něm zůstala přes noc na třepačce za pokojové teploty. Následujícího dne byla k JB-4 roztoku A+C přidána složka B, na 1 ml 0,04 ml. Embrya byla převedena do tohoto roztoku na 60

sekund, a po této době byl roztok obměněn. Embrya v JB-4 roztoku (A+C)+B byla napolohována v silikonových či plastových bločkách a překryta plátkem parafilmu, aby se zamezilo v přístupu vzduchu k tuhneoucímu roztoku. Po ztvrdnutí bloček s embryi, což trvalo minimálně jeden den, byly vzorky nařezány na mikrotomu Leica RM2155 na řezy o tloušťce 5 μm , a ponechány uschnout na podložním skle při teplotě 45° C. Podložní skla se vzorky byly dále barveny v histologickém barvivu Azure-B/eosin (Serva) (0,4ml Azure-B a 0,1ml Eosin na 12,5ml dH₂O) po dobu \approx 3 minut. Po obarvení řezů byla skla promývána v dH₂O, aby se vyplavilo všechno nenavázané barvivo. Skla s řezy byla ponechána na náhřevné desce při teplotě 45° C až do jejich uschnutí. Jako konečný krok byla na řezy nanášena pryskyřice DPX (Sigma), vzorky byly přiklopeny krycími skly, a ponechány přes noc zaschnout.

2.3 Imunohistochemie

2.3.1 Celkovostní barvení

V methanolu skladovaná embrya byla přendána do dentova fixativa (80 % methanol a 20 % dimethylsulfoxid) na dobu 1 h při pokojové teplotě. Poté byla embrya přenesena do bělicího roztoku (dentovo fixativum se 30% peroxidem vodíku (Penta) v poměru 2:1) a přes noc ponechána na laboratorní třepačce pod zdrojem světla. Následný den byla vybělená embrya promyta v roztoku PBS s 0,4 % tritonu X-100 (Sigma) (PBS + triton) po dobu 10 minut, a poté přenesena do 4% hovězího sérového albuminu (Sigma) rozpuštěného v PBS (BSA) na dobu 1 h při pokojové teplotě. Dále byl tento roztok obměněn opět za 4% BSA, avšak s přidáním primárními protilátkami v koncentraci od 1:400-1:1000, dle použité protilátky (SOX10 v koncentraci 1:400, SOX9 a fibronectin v koncentraci 1:1000). Embrya byla ponechána v tomto roztoku po dobu 4-5 dnů při teplotě 4 °C. Po této době byla embrya promyta opět v PBS + triton 3 \times po 10 minutách. Poté byl roztok obměněn za 4% BSA se sekundárními protilátkami při koncentraci 1:1000. Takto byla embrya ponechána 3-4 dny při 4 °C. Poté byla embrya promyta v PBS 2 \times po 10 minutách, a následně převedena do 75% glycerolu s PBS. Po \approx 3 dnech byla embrya nasnímána v petriho misce s agarovým podložím a 75% glycerolem.

2.3.2 JB-4 řezy

Embrya byla nejprve protilátkově označena stejným postupem jako u celkovostního barvení 2.3. Namísto převedení embryí do 75% glycerolu však byla embrya převedena do 99,6% ethanolu alkoholovou řadou po 25 % s časem promytí 10 minut v každém kroku. Dále byly zhotoveny bločky JB-4 s embryi podle postupu zmíněného v podkapitole Histochemie 2.2, a embrya byla nařezána na plátky o síle 5 μm na mikrotomu Leica RM2155. Po uschnutí řezů na podložním sklíčku byly dále vzorky ohraničeny hydrofobním popisovačem, zakápnuty fluoroshieldem s DAPI (Sigma) a překryty krycím sklem, jež bylo posléze zalakováno ke sklu podložnímu.

2.3.3 Agarové řezy

V methanolu skladovaná embrya byla převedena do PBS postupnou alkoholovou řadou po 25 % s časem promytí 10 minut v každém jednom kroku. Poté, co byla v PBS ponechána také 10 minut, byla přendána do rozpuštěného roztoku agarózy připravené ze 2 g agarózy (Sigma) na 40 ml dH₂O) s teplotou ≈ 68 °C. Poté, co roztok agarózy s embryi zatushl, byly takto připravené vzorky seřezány do bločků, které byly nařezány na vibratomu firmy Leica, modelu VT12000 Sn na řezy o síle 40 μ m. Tyto řezy byly promývány po dobu 10 minut v PBS s tritonem, a dále v 1% BSA na 1 h při pokojové teplotě. Posléze bylo BSA obměněno za 1% BSA s přidanými primárními protilátkami s koncentrací 1:400-1:1000 (SOX10 v koncentraci 1:400, SOX9 a fibronectin v koncentraci 1:1000), a ponechána přes noc při teplotě 4 °C. Následný den byly řezy promyty v roztoku PBS s tritonem 3 \times po dobu 10 minut, a exponovány na 2,5 h při pokojové teplotě 1% BSA se sekundárními protilátkami s koncentrací 1:1000. Po uplynutí této doby byly řezy promyty v PBS 2 \times po dobu 10 minut a dále přeneseny na podložní sklíčko, kde byly následně zakápnuty fluoroshieldem s DAPI, překryty krycím sklem a konečně zalakovány.

2.3.4 Použité protilátky

SOX9 (Sigma) HPA001758; SOX10 (Abcam) ab229331; fibronectin (Dako) A 0245; DAPI (Sigma).

2.4 Injikace a odchov

Nejprve byla embrya zbavena vaječného obalu. Poté bylo připraveno fluorescenční barvivo tvořené CM-DiI (Invitrogen) rozpuštěným v 10% roztoku sacharózy v poměru 1:5. V petriho misce s dezinfikovaným plastelinovým podložím naplněné destilovanou vodou byla embrya nejprve ukotvena, aby se zabránilo jejich pohybu při samotné injikaci, a následně byla injikována ústním injikátorem do mediální roviny dorzální části trupu, v místě vzniku nervové trubice. Ačkoli se injikovaná stádia lišila a tím pádem i místo injikace, nejlepších výsledků bylo dosaženo injikováním barviva do lumen nervové trubice ve stadiu 24. Po injikacích byla embrya bichirů týden odchovávaná v zatemnělé jamkové destičce s provzdušněnou destilovanou vodou, jež byla denně obměňována. Poté byla destilovaná voda obměněna za vodu tvořenou napůl z destilované, a napůl z odstáté kohoutkové vody. Po třech dnech byla embrya následně převedena do velké zatemnělé nádoby s odstátou kohoutkovou vodou, obměňovanou 2 \times týdně, a s přívodem vzduchu. Po stáří cca dvou týdnů byly larvy krmeny nitěnkami obecnými nasekanými najemno, později celistvými, v závislosti na velikosti a stáří jedince.

2.5 Zpracování dat

Protílkově barvená embrya z celkovostního pohledu byla snímána na stereomikroskopu Zeiss Lumar.V12 s kamerou AxioCam HRm v softwarovém programu ZEN PRO od firmy

Zeiss. Histologické preparáty, agarové a JB-4 řezy embryi byly snímány na mikroskopu Olympus BX51 s kamerou Olympus DP74 a zdrojem fluorescenčního záření Olympus U-RTF-T. Použitý software pro zpracování obrazu z kamery byl cellSens firmy Olympus. Řezy experimentálními embryi bichira byly snímány stejným mikroskopem a fluorescenčním zdrojem, avšak kamerou RT slider firmy Diagnostic instruments, inc. a softwarem Spot. Finální zpracování všech snímků bylo poté provedeno v rastrovém grafickém editoru Adobe Photoshop CC 2019. Tabule byly sestaveny v Adobe InDesign CC 2019. Doplnující schémata byla vytvořena za pomoci softwaru Adobe Illustrator CC 2019. Samotná diplomová práce byla sepsána v online editoru Overleaf používající pro sazbu textu program \LaTeX .

3. Výsledky

3.1 Vznik buněk trupové neurální lišty

První krok pro studium buněk trupové neurální lišty (bTNL) u bichira, jesetera a kostlína jsem si stanovil určení doby jejich vzniku. K tomu vhodně posloužila data Mgr. Jana Štundla, Ph.D., jenž se zabýval buňkami hlavové neurální lišty v rámci téže laboratoře kraniofaciálního vývoje a evoluce. Z jeho dat *in situ* hybridizovaných embryích pro gen *Sox9* se dá zjistit, kdy se buňky neurální lišty objevují také v trupu (Tabule 1).

U bichira se bTNL objevují ve stadiu 23 v podobě úzkého pruhu táhnoucím se od konce hlavy mediálně po dorzální straně až do $\frac{2}{3}$ délky trupu (Tabule 1A). V následujícím stadiu 24 je pruh exprese silnější a širší v laterálním směru, a sahá od konce hlavy až téměř ke konci ocasního pupene (Tabule 1B). U jesetera se bTNL objevují ve stadiu 23 v podobě širšího řídkého pruhu táhnoucím se od konce hlavy mediálně po dorzální straně embrya (Tabule 1C). Ve stadiu 24 je poté tento pruh užší v laterálním směru, a je hustěji osídlen buňkami po celé délce trupu (Tabule 1D). U kostlína se bTNL objevují ve stadiu 17 v podobě úzkého pruhu táhnoucím se od konce hlavy mediálně po dorzální straně až do $\frac{2}{3}$ délky trupu (Tabule 1E). Ve stadiu 18 je poté tento pruh signálu výraznější, a je přítomen téměř po celé délce trupu embrya (Tabule 1F).

Jak se ukazuje na těchto datech, bTNL u všech tří zástupců bazálních paprskoploutvých ryb vznikají mediálně na dorzální straně trupu po celé jeho délce a v antero-posteriorním rázu.

3.1.1 Celkovostní vizualizace místa a dynamiky vzniku bTNL

Technika *in situ* hybridizace vizualizuje pouze expresi genu a nikoli přítomnost jejího produktu. Pro ověření platnosti těchto dat jsem dále použil techniku celkovostního protilátkového barvení vůči proteinu SOX9, jež navíc ve větším detailu dokáže vykázat jednotlivé bTNL u studovaných druhů (Tabule 2).

U bichira stadia 22 není v trupu přítomen žádný pozitivní signál pro SOX9, značící přítomnost bTNL (Tabule 2A). První bTNL se v trupu bichira objevují ve stadiu 23 mediálně na dorzální straně trupu (Tabule 2B). Tyto buňky navíc vykazují antero-posteriorní ráz vzniku. Zatímco v anteriorní části trupu od otické kapsule do poloviny trupu jsou bTNL rozšířeny jak mediálně tak laterálně a pravděpodobně jsou již ve fázi migrace, v posteriorní části trupu se bTNL vyskytují mediálně v podobě tenkého pruhu,

a zřejmě právě prošly delaminací. Posléze se bTNL rozšiřují laterálně a zahajují migraci i posteriorněji uložené buňky. Ve stadiu 24+ migrují bTNL od otické kapsule do $\frac{2}{3}$ délky trupu (Tabule 2C). U jesteru jsou bTNL viditelné ve stadiu 23 v uzavírajících se neurálních valech, a tvoří tak dva mediálně se táhnoucí pruhy oddělené neurální brázdou po dorzální straně trupu embrya (Tabule 2D). Z toho vyplývá, že SOX9 je v bTNL jesteru přítomen ještě před jejich delaminací. Vedle signálu v nascentních bTNL se v tomto stadiu vyskytuje pozitivní signál pro SOX9 také v somitech, což se projevuje metamericky uspořádanými pruhy po antero-posteriorní ose, kolmých na mediální rovinu. Následně tvoří bTNL ve stadiu 24 úzký mediální pruh na dorzální straně celé délky trupu (Tabule 2E). V anteriorní části trupu hned za otickou kapsulí jsou bTNL rozšířené laterálně a zřejmě již zahajují migraci, zatímco posteriorně uložené bTNL pravděpodobně prochází teprve delaminací. Pozitivní signál v somitech přetrvává také v tomto vývojovém stadiu. Ve stadiu 25 bTNL tvoří stále mediální pruh na dorzální straně embrya (Tabule 2F). V anteriorní části trupu je zjevná pokračující migrace bTNL postupující v antero-posteriorním sledu. Signál pro SOX9 je ve stadiu 25 stále přítomen v somitech, ač viditelný s menší intenzitou. U kostlína jsou bTNL poprvé pozorovatelné ve stadiu 16, kdy tvoří široký pruh mediálně se táhnoucí po dorzální straně trupu (Tabule 2G). Tento pruh tvořený bTNL je mediálně užší a nabývá zřetelnějších kontur ve stadiu 17 (Tabule 2H). Vedle signálu v bTNL je ve stadiu 17 přítomen také pozitivní signál v somitech, mající metamericky uspořádaný vzor po antero-posteriorní ose v pružích kolmých na mediální rovinu (Tabule 2H). Ve stadiu 18 se bTNL rozšiřují z mediální roviny laterálně, a zřejmě zahajují migraci (Tabule 2I). Viditelný je antero-posteriorní ráz zahájení této migrace. Pozitivní signál pro SOX9 je i ve stadiu 18 stále přítomen v somitech, mající stejný vzor.

3.2 Analýza lokace bTNL v rámci neuroektodermu a místa jejich delaminace

3.2.1 Přítomnost bTNL v rámci neuroektodermu

Embrya studovaných druhů protilátkově barvená vůči SOX9 jsem analyzoval na transverzálních řezech, abych zjistil, zda-li je raná přítomnost SOX9 průvodní s delaminací, či jestli bTNL jsou pozitivní na SOX9 ještě v rámci neuroektodermu (Tabule 3).

U bichira ve stadiu 23, kdy jsem pozoroval první signál pro SOX9 v bTNL, je na řezech viditelné, že jsou tyto buňky stále součástí neuroektodermu, kde zahajují delaminaci (Tabule 3A). Ve stadiu 24 progresivnější buňky, které již delaminovaly, zahajují migraci, zatímco opožděné bTNL teprve delaminují z neuroektodermu (Tabule 3B). U jesteru se bTNL vyskytují na dorzální straně neurálních valů ve stadiu 23 před jejich splynutím (Tabule 3C). Pozitivní signál pro SOX9 je přítomen také v somitech a buňkách vyskytujících se v rámci endodermu, v těsné blízkosti notochordu. Poté, co neurální valy ve stadiu 24 splývají za vzniku nervové trubice, bTNL zahajují delaminaci na dorzální straně nervové trubice v mediální rovině (Tabule 3D). Signál pro SOX9 je navíc ve stadiu 24 přítomen stále v buňkách somitů i v buňkách endodermu blízko notochordu. Na

transverzálních řezech trupem kostlína stadia 17 je viditelné, že bTNL jsou v těsném kontaktu s neuroektodermem na jeho dorzální straně (Tabule 3E). Nejprogresivnější buňky pravděpodobně prochází delaminací. Pozitivní signál pro SOX9 je v tomto stadiu viditelný také v buňkách odlišných tkání, ač s menší intenzitou. Ve stadiu 17+ jeví většina bTNL rozvolněné seskupení na dorzální straně neuroektodermu, a prochází již nejspíše delaminací, nejprogresivnější z nich zahajují migraci (Tabule 3F).

Z těchto dat vyplývá, že bTNL u bichira vykazují prvotní přítomnost SOX9 v průběhu delaminace, zatímco u jesetera a kostlína projevují SOX9 ještě dříve před delaminací.

3.2.2 Anatomie neuroektodermu a místo delaminace bTNL

Chtěl jsem zjistit, z jaké části neuroektodermu po dorzo-ventrální ose bTNL delaminují. Pro to jsem provedl analýzu na transverzálních řezech trupů embryí studovaných druhů, jež jsem histologicky obarvil azure B/eosinem. To mi poskytlo vhodný náhled na anatomii neuroektodermu (neurální trubice/neurálního kýlu; viz Matějková (2018) [102]) a místo delaminace bTNL (Tabule 4). Komplementárně jsem analyzoval také transverzální řezy stejnými vývojovými stádii, která jsem obarvil protilátkově vůči fibronektinu a buněčným jádrům. To mi umožnilo pozorovat kontinuitu bazální laminy neuroektodermu s lokálním přerušením v místě delaminace bTNL, a také mezenchymatické buňky v mimobuněčném prostoru ohraničené bazálními laminami tělních kompartmentů, představující bTNL (Tabule 4).

Na histologicky barveném transverzálním řezu trupu bichira stadia 24 je viditelná buněčná nesourodost v dorzální části nervové trubice, která má jinak ve zbytku své stavby epiteliální seskupení (Tabule 4A). Buňky součástí této buněčné nesourodosti pod ektodermem zjevně představují delaminující bTNL. Na protilátkově barveném transverzálním řezu téhož stadia si lze povšimnou přerušené bazální laminy na dorzálním vrcholu nervové trubice s přidruženou bTNL právě procházející delaminací (Tabule 4B). Buňka vtěsnaná mezi bazálními laminami nervové trubice a ektodermu představuje již delaminovanou bTNL. Na histologicky barveném transverzálním řezu trupu jesetera stadia 24 jeví nervová trubice epiteliální charakter po celém svém obvodu, a nelze tak určit místo delaminace bTNL (Tabule 4C). Avšak na protilátkově barveném transverzálním řezu téhož stadia si lze všimnou přerušené bazální laminy v dorzální části nervové trubice s delaminujícími bTNL (Tabule 4D). Na histologicky barveném transverzálním řezu trupu kostlína stadia 17 je neurální kýl tvořen buňkami v epiteliálním seskupení, s výjimkou jeho dorzální části, kde jsou buňky volné v podobě mezenchymu (Tabule 4E). Na protilátkově barveném transverzálním řezu trupem kostlína stadia 17+ je viditelná zeslabená a místy přerušená bazální lamina neurálního kýlu na jeho dorzální straně společně s delaminujícími bTNL (Tabule 4F).

U všech tří studovaných zástupců bazálních paprskoploutvých ryb bTNL delaminují z dorzální strany neuroektodermu. U bichira a jesetera ve stadiu po splynutí neurálních valů za vzniku nervové trubice, u kostlína ve stadiu, kdy dochází k zahájení kavitace neurálního kýlu v nervovou trubici [102].

3.3 Analýza konkrétních cest migrace bTNL

Použití SOX9 se ukázalo jako nevhodné pro pozorování bTNL během migrace, neboť pozitivní signál je přítomen vyjma bTNL také v buňkách notochordu a buňkách všech kompartmentů somitů. Při analýze transversálních řezů barvených vůči SOX9 jsem nedokázal odlišit pozitivní bTNL od pozitivně značených buněk somitů. Z toho důvodu jsem musel zvolit takovou protilátku, jež vykazuje bTNL, ale jejíž přítomnost v ostatních buněčných typech neznesnadňuje pozorování cest migrace bTNL. Jako vhodným kandidátem pro tento účel se jevila protilátka HNK-1, klasicky užívaná právě pro vyobrazení cest migrace bTNL [49, 50, 59, 60, 103]. Nicméně, na mnou studovaných nemodelových druzích se HNK-1 protilátka (Abcam ab82749) ukázala jako nefunkční, a to i při mnohačetných úpravách protokolu a použití techniky barvení na parafinových řezech. Jediný pozitivní signál pro HNK-1 se objevoval nespécificky v nervové trubici, a navíc v době, kdy již bTNL migrují. Namísto HNK-1 protilátky jsem se rozhodl použít protilátku vůči proteinu SOX10, jež je přítomen v bTNL během migrace a také během diferenciaci [104]. Navíc, *Sox10* je hojně užívaným markerem bTNL [93, 94, 71, 105]. Nejprve jsem použil monoklonální myší protilátku SOX10 (Abcam ab212843), abych mohl následně provést dvojité barvení společně s králičí protilátkou vůči fibronektinu. Tato protilátka se však také ukázala být nefunkční na mnou studovaných druzích. Místo toho jsem dále použil polyklonální králičí protilátku SOX10 (ab229331). Ukázalo se, že tato protilátka při vyšší koncentraci značí bTNL, naneštěstí také ektoderm, zvláště silně pak u embryí bichira. Tato skutečnost může představovat problém pro pozorování bTNL migrujících dorzo-laterální cestou, nicméně nepředstavuje problém pro sledování migrace bTNL cestou ventro-mediální. Za komparativním účelem jsem embrya stejných či blíže vývojových stádií barvil také protilátkově vůči fibronektinu a buněčným jádrům, abych vykázal migrují bTNL v mezibuněčném prostoru vymezeného právě fibronektinem, u nichž nedochází k expresi *Sox10*. Získaná data jsem rozdělil na část o rané migraci, kdy bTNL zahajují migraci a migrují zvláště ventro-mediální cestou, a na část o pozdní migraci, kdy dochází k rané diferenciaci bTNL a migraci dorzo-laterální cestou. Zatímco data pro ranou migraci byla provedena a ověřena několikrát během optimalizace techniky a samotného postupu, data pro pozdní migraci byla získána nanejvýš ze dvou jedinců stejného stadia, a to z důvodu nízkého počtu vlastněných embryí.

3.3.1 Bichir senegalský

Raná migrace

Na transversálních řezech protilátkově barvených embryí bichira vůči SOX10 proteinu jsou bTNL ve stadiu 24 přítomné v prostoru mezi dorzální stranou nervové trubice a ektodermem, odkud počínají svou migraci (Tabule 5A). Poté bTNL vstupují na ventro-mediální cestu, a ve stadiu 26 již dosahují úrovně dorzální strany notochordu (Tabule 5B). Méně progresivnější bTNL jsou v tomto stadiu viditelné v okolí nervové trubice. Dále bTNL migrují ventrálně a ve stadiu 28 jsou viditelné již v okolí notochordu (Tabule 5C). Signál

v nejventrálněji migrujících buňkách je však znatelně slabší než v buňkách migrujících dorzálně v okolí nervové trubice. Pozorovatelné jsou ve stadiu 28 také bTNL v mezenchymu hřbetní ploutve. Dále bTNL pokračují v migraci ventro-mediální cestou, a dosahují úrovně dorzální aorty ve stadiu 30 (Tabule 5D). Stále jsou však bTNL viditelné po celé délce ventro-mediální cesty, tedy od úrovně nervové trubice po úroveň dorzální aorty. Stejně jako na řezech stadia 28 je ve stadiu 30 patrné snížení intenzity signálu pro SOX10 v bTNL s uraženou ventrální vzdáleností.

Na transverzálních řezech komparativně barvených embryí vůči fibronektinu a buněčným jádrům jsou ve stadiu 24 mezenchymální buňky přítomny mezi bazálními lamami ektodermu a nervové trubice (Tabule 5E). Ve stadiu 26 se volné buňky nachází na ventro-mediální cestě v blízkosti nervové trubice a v okolí notochordu (Tabule 5F). Později ve stadiu 28 jsou mezenchymální buňky pozorovatelné po celé ventromediální cestě, od úrovně nervové trubice až po oblast dorzální aorty (Tabule 5G). Ve stadiu 30 jsou volné buňky přítomny taktéž po celé ventro-mediální cestě až k dorzální aortě (Tabule 5H).

Pozdní migrace

První bTNL migrující dorzo-laterální cestou jsou pozorovatelné až ve stadiu 30, a to na začátku této cesty v prostoru mezi dorzálním vrcholem myotomu a ektodermem (Tabule 6A). Později ve stadiu 33 jsou bTNL dále viditelné na dorzo-laterální cestě v prostoru mezi myotomem a ektodermem na laterální straně embrya (Tabule 6B). V tomto stadiu tvoří bTNL také shluky mezi ektodermem a myotomem na laterální straně embrya, kde pravděpodobně diferencují v ganglia neuromastů postranní čáry (Tabule 6B). bTNL jsou také přítomny v prostoru myosept (horizontální data neukázána) (Tabule 6B). Signál pro SOX10 je ve stadiu 33 přítomný také v buňkách zakládajících se párových spinálních gangliích uložených laterálně od nervové trubice (Tabule 6C). Dále jsou bTNL pozorovány také v mezenchymu dorzální ploutve (Tabule 6D). Podél ventro-mediální cesty však nebyl ve stadiu 33 pozorován žádný pozitivní signál pro SOX10.

3.3.2 Jeseter malý

Raná migrace

Na transverzálních řezech protilátkově barvených embryí jesetera vůči SOX10 začínají bTNL migrovat ve stadiu 25 z mezibuněčného prostoru mezi nervovou trubicí, dorzálním vrcholem somitu a ektodermem (Tabule 7A). Dále bTNL vstupují na ventro-mediální cestu, a ve stadiu 26 již migrují v prostoru mezi nervovou trubicí a přiléhajícími somity (Tabule 7B). Úroveň ventrální strany notochordu dosahují bTNL ve stadiu 28 (Tabule 7C). Ve stadiu 33 jsou bTNL pozorovatelné po celé délce ventro-mediální cesty, od úrovně nervové trubice po oblast ventrální strany notochordu (Tabule 7D). První projevem diferenciace bTNL jsou spinální ganglia uložená laterálně od nervové trubice (Tabule 7D).

Na transverzálních řezech komparativně barvených embryí vůči fibronektinu a buněčným jádrům jsou ve stadiu 25 viditelné mezenchymální buňky v prostoru mezi bazálními

laminami nervové trubice a ektodermu (Tabule 7E). Ve stadiu 27 se volné buňky nachází v mezibuněčném prostoru mezi nervovou trubicí a přiléhajícím somitem, nejventrálněji dosahují úrovně dorzální strany notochordu (Tabule 7F). Ve stadiu 28 se volné buňky nachází po ventro-mediální cestě od úrovně nervové trubice až po ventrální hranici notochordu (Tabule 7G). Ve stadiu 30 jsou volné buňky přítomné po celé délce ventro-mediální cesty, od úrovně nervové trubice až po úroveň ventrální strany notochordu (Tabule 7H).

Pozdní migrace

Ve stadiu 33 jsou bTNL viditelné ve větší denzitě pod notochordem, kde mohou diferencovat v chromafinní buňky či sympatická ganglia (Tabule 8A). V tomto stadiu jsou bTNL součástí formujících se spinálních ganglií (Tabule 8B) a pravděpodobně tvoří také sympatická ganglia ventrálně od notochordu (Tabule 8C). Migrující bTNL byly u analyzovaných stadií pozorovány jen na ventro-mediální cestě. Na dorzo-laterální cestě a ani v blízkosti hřbetní ploutve nebyly tyto buňky za pomoci SOX10 vykázány.

3.3.3 Kostlín mexický

Raná migrace

Na transverzálních řezech protilátkově barvených embryí kostlína vůči SOX10 jsou bTNL ve stadiu 18 přítomny v mezibuněčném prostoru mezi laterální stranou neurálního kýlu, dorzálním vrcholem somitu a ektodermem, odkud počínají migrovat (Tabule 9A). Ihned na to vstupují bTNL na ventro-mediální cestu, a již ve stadiu 19 jsou přítomny v okolí notochordu, a také se bTNL vyskytují v mimobuněčném prostoru podél dorzální strany nervové trubice. V tomto stadiu je také možné výjimečně pozorovat bTNL migrující dorzo-laterální cestou mezi somitem a ektodermem v dorzální části trupu (Tabule 9B). Dále bTNL migrují ventro-mediální cestou, kde dosahují úrovně ventrální strany notochordu ve stadiu 20 (Tabule 9C). V tomto stadiu tvoří bTNL také shluky v prostoru dorzálně od nervové trubice. Stejně tak ve stadiu 23 jsou bTNL přítomny ve shluku nad nervovou trubicí a také po ventro-mediální cestě od úrovně nervové trubice po oblast dorzální aorty (Tabule 9D).

Na transverzálních řezech komparativně barvených embryí vůči fibronektinu a buněčným jádrům jsou ve stadiu 17 přítomny mezenchymální buňky v prostoru mezi neurálním kýlem, dorzálním vrcholem somitu a ektodermem (Tabule 9E). Ve stadiu 18+ jsou volné buňky přítomny na ventro-mediální cestě v okolí nervové trubice, nejventrálněji dosahují dorzálního okraje notochordu (Tabule 9F). Ve stadiu 20+ jsou volné buňky přítomny po ventro-mediální cestě od úrovně nervové trubice až po ventrální okraj notochordu (Tabule 9G). Ve stadiu 23 se volné buňky nachází po celé délce ventro-mediální cesty, od úrovně nervové trubice dále po ventrální stranu notochordu (Tabule 9H).

Pozdní migrace

Výraznou migraci bTNL dorzo-laterální cestou ve formaci řetízku je možné pozorovat ve stadiu 31 mezi myotomem a ektodermem na dorzální straně embrya (Tabule 10A). V tomto stadiu jsou bTNL také součástí párových spinálních ganglií uložených po stranách nervové trubice (Tabule 10B), a jsou také viditelné v mezenchymu hřbetní ploutve (Tabule 10C).

3.4 Analýza vztahu mezi migrací bTNL a somity

Somity tvoří v trupu objemné kompartmenty, jež ovlivňují bTNL během migrace a definují také jednotlivé cesty migrace. Proto jsem chtěl zjistit, jaký vztah se uplatňuje mezi migrací bTNL a samotnými somity. Na transverzálních řezech trupem embryí studovaných druhů protilátkově barvených vůči SOX10 a myotomu lze pozorovat vztah těchto dvou buněčných populací (Tabule 11).

U bichira ve stadiu 23+ jsou bTNL viditelné dorzálně od nervové trubice právě po delaminaci. Somit tvoří kompaktní útvar bez zjevné diferenciaci na myotom, dermatom a sklerotom (Tabule 11A). Ve stadiu 24, kdy buňky trupové neurální lišty zahajují migraci, somit projevuje na své mediální straně diferenciaci myotomu (Tabule 11B). Ve stadiu 25+, kdy bTNL dosahují úrovně notochordu, je valná většina původního somitu tvořena myotomem (Tabule 11C). U jesetera ve 25 vprostřed délky trupu, kde bTNL delaminují, tvoří somit kompaktní útvar (Tabule 11D). Při zahájení migrace bTNL ve stadiu 26 lze pozorovat zahájení diferenciaci somitu v myotom na jeho mediální straně (Tabule 11E). Ve stadiu 27, kdy bTNL migrují ventro-mediální cestou a dosahují úrovně notochordu, myotom tvoří téměř celou mediální část původního somitu s výjimkou nejdorzálnějšího vrcholu v blízkosti nervové trubice (Tabule 11F). U kostlína ve stadiu 18, v čase zahájení migrace bTNL jsou somity stále kompaktní (Tabule 11G). Ve stadiu 19, kdy bTNL migrují ventro-mediální cestou a jsou přítomny v okolí notochordu, myotomy zahajují diferenciaci na mediální straně somitů (Tabule 11H). Ve stadiu 20 poté tvoří myotom téměř celou mediální část původního somitu, s výjimkou nejdorzálnějšího vrcholu v blízkosti nervové trubice (Tabule 11I).

Na prezentovaných datech se ukazuje, že bTNL počínají migrovat ve stejný čas, kdy se dochází k rozpadu epiteliálního somitu a jeho diferenciaci v myotom na mediální straně.

3.5 Analýza závislosti segmentální migrace na dorzo-ventrální úrovni

Při analyzování transverzálních řezů protilátkově barvených vůči SOX10 jsem si povšiml, že se bTNL v okolí ventrální části notochordu vyskytují častokrát jen na pravé či levé straně (např. Tabule 7D). To mě přivedlo k úvaze, že se bTNL přibližně v oblasti notochordu segmentují v anerio-posteriorní ose, a to, jestli se vyskytují na pravé či levé straně může být dáno třeba jen mírným odklonem transverzálního řezu od kolmice k mediální

rovině. Z toho důvodu jsem dále provedl analýzu na horizontálních řezech studovaných druhů. Embrya byla protilátkově barvena vůči SOX10 za účelem vizualizace bTNL, a značena také markerem 12/101 vůči myotomům, aby byly jasněji viditelné jednotlivé tělní segmenty trupu představované právě myotomy (Tabule 12).

U bichira ve stadiu 28 v úrovni nervové trubice vykazují bTNL nesegmentovaný způsob migrace po antero-posteriorní ose (Tabule 12A), a jsou přítomny po celé délce jednotlivých somitů. Ventrálně v úrovni notochordu u stejného embrya se však bTNL shlukují po antero-posteriorní ose, přesně vprostřed délky jednotlivých segmentů (Tabule 12B). Na jeden segment se vyskytuje také velmi malé množství bTNL. U jesetera ve stadiu 27 se v úrovni nervové trubice vyskytují bTNL nesegmentovaně po antero-posteriorní ose, a jsou přítomny po celé délce somitů (Tabule 12C). Ventrálně v úrovni notochordu téhož embrya jsou bTNL naopak shluknuty vprostřed délky jednotlivých somitů, a projevují tak segmentální vzor uspořádání po antero-posteriorní ose (Tabule 12D). Stejně jako u bichira čítají jednotlivé shluky malé množství buněk na jeden somit. U kostlína ve stadiu 21 jsou v úrovni nervové trubice bTNL nesegmentované po antero-posteriorní ose, a nachází se po celé délce jednotlivých somitů (Tabule 12E). V úrovni notochordu téhož embrya jsou však bTNL shluknuty vprostřed délky jednotlivých segmentů jako u bichira a jesetera, a vykazují tak antero-posteriorní segmentaci během migrace (Tabule 12F). Množství bTNL na jeden segment je však větší než u zmíněných druhů.

Během ventro-mediální cesty se bTNL u všech tří studovaných druhů segmentují po antero-posteriorní ose, přibližně v úrovni předělu nervové trubice a notochordu. Ventrálně od této úrovně pak bTNL migrují mezibuněčným prostorem ventro-mediální cesty vprostřed délky jednotlivých tělních segmentů. Analýza horizontálních řezů barvených vůči SOX10 a svalovině u studovaných druhů neodhalila bTNL uvnitř somitů/myotomů.

3.6 Experimentální značení buněk trupové neurální lišty bichira

Chtěl jsem otestovat hypotézu, zda-li se bTNL podílí na tvorbě některé z tkání ganoidní šupiny a disponují tak skeletogenním potenciálem. Za tímto účelem byla použita technika mapování buněčného osudu injekcí lipofilního fluorescenčního barviva CM-DiI, jež se váže na buňky, se kterými přijde do styku, a vydrží na nich navázané i po dlouhou dobu vývoje. To je žádoucí, uvažujeme-li dlouhou dobu, než se šupiny u bichira začnou tvořit. Celkem bylo provedeno 7 sérií injekcí s celkovým počtem 104 nainjekovaných embryí bichira. Po optimalizaci jak injikačního postupu, tak samotného odchovu embryí a larev, se podařilo odchovat 3 jedince do stáří 3 měsíců, kdy jsme uvažovali první vznik ganoidních šupin v trupu. Analýza nejvhodnějšího jedince se stářím 3,5 měsíce věku se však nezdařila.

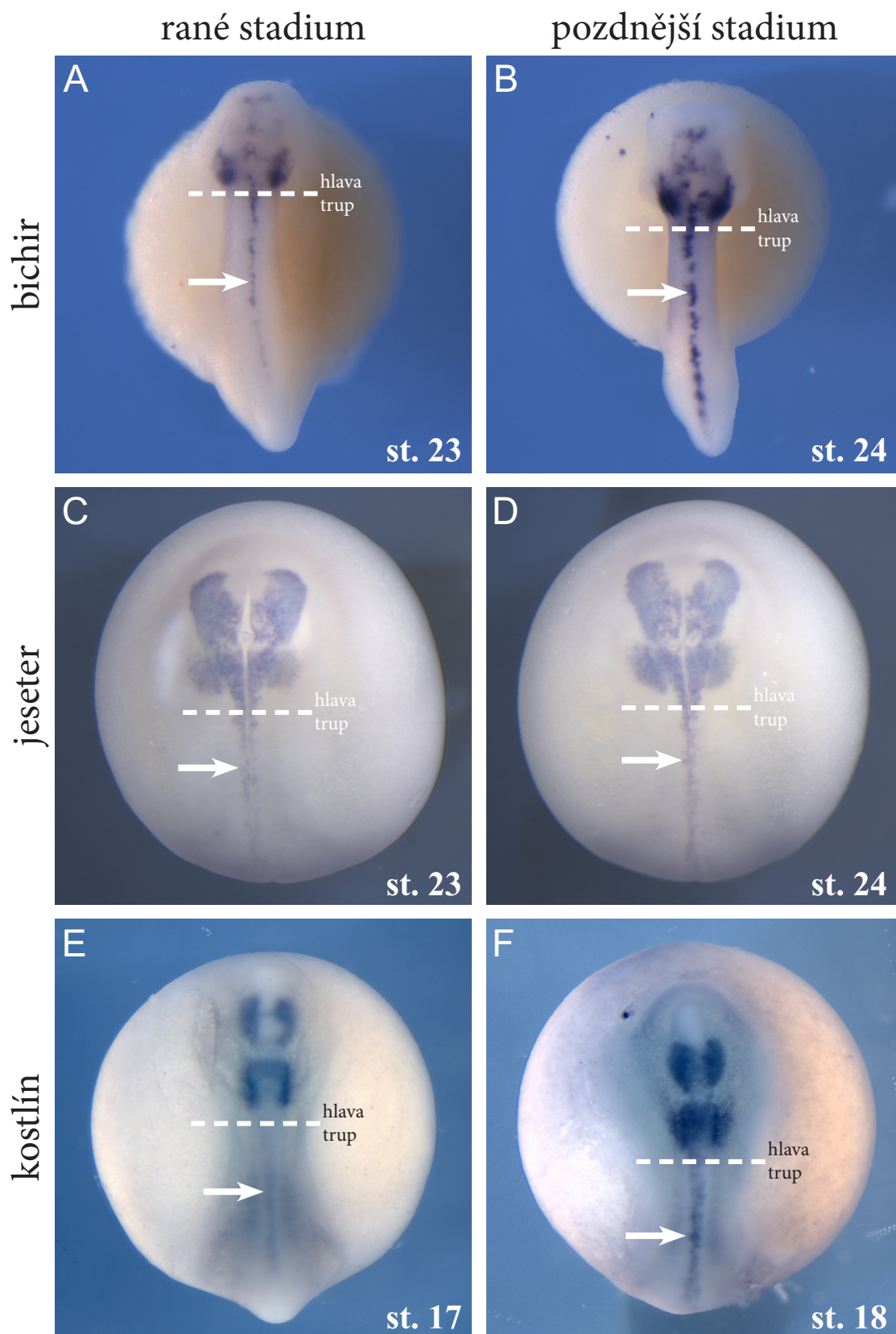
Bichiři byli injikováni ve stadiích 22-25, buď do místa uzavírající se nervové trubice, nebo do lumen již zformované nervové trubice, což přineslo lepší výsledky oproti dříve zmíněnému. Při injikování pouze samotným CM-DiI nastaly u embryí nežádoucí vývojové vady v oblasti trupu. Nejlepším kompromisem mezi letální koncentrací neředitelného CM-DiI a koncentrací se srážející se konzistencí při velkém poměru barviva s ředícím roztokem

se ukázal poměr CM-DiI ku 10% roztoku sacharózy 1:5, viz Minařík & spol., 2017 [106]. Jako příklad uvedu injikované embrya bichira ve stadiu 24 (Tabule 13A). Barvivo bylo vpraveno do lumen nervové trubice, s místem injikace v mediáně na dorzální straně trupu, přibližně v polovině jeho délky. Barvivo prostoupilo lumen nervové trubice až do oblasti hlavy. Abych ověřil, jestli opravdu došlo k označení nervové trubice s nascentními bTNL, toto embryo jsem zafixoval 1 den po injikaci ve stadiu 27 ve 4% roztoku PFA, protilátkově obarvil vůči fibronektinu, a analyzoval na řezech. Barvivo bylo přítomno pouze v rámci nervové trubice (Tabule 13B). Jiné embryo ze stejné série injikované totožným způsobem jsem zafixoval 2 dny po injikaci ve stadiu 29, opět obarvil protilátkově vůči fibronektinu a analyzoval na řezech. Barvivo bylo přítomno jak v rámci nervové trubice, tak i v bTNL migrujících ventro mediální cestou (Tabule 13C). Nejventrálněji označená bTNL se nacházela v úrovni notochordu. Tyto výsledky mi potvrdili přesnost označení bTNL, ač v porovnání s protilátkovým barvením na SOX10 ne ty nejraněji migrující bTNL.

Ze dvou injikačních sérií jsem zafixoval a následně analyzoval několik injikovaných embryí, abych získal komplementární data o migraci bTNL technikou značení buněk *in vivo*. Zafixováno bylo celkem 18 injikovaných embryí po 24 hodinách vývoje, od stadia cca 26 do stadia 36. Analýza na řezech těchto experimentálních embryí ukázala přítomný signál CM-DiI v mnoha derivátech (Tabule 14), spíše než v migrujících bTNL. Označené bTNL byly pozorovány migrující v okolí nervové trubice na ventro-mediální cestě ($n=5$). Barvivo CM-DiI bylo přítomno v buněčných shlucích pod epidermis na laterálních stranách embrya ($n=4$), představující pravděpodobně ganglia neuromastů postranní linie (Tabule 14A). Pozitivní signál byl přítomen také ve spinálních gangliích ($n=4$), párově uložených laterálně od nervové trubice (Tabule 14B). Pozitivní signál byl přítomen i těsně okolo notochordu ($n=3$), což může značit jako derivát bTNL obal notochordu, nebo místo setrvání bTNL před následnou migrací (Tabule 14C). Pozorovány byly také označené buňky v prostoru myosept ($n=3$), jejichž pozice v tomto prostoru byla určena z horizontálních dat zde neuvedených (Tabule 14D). Fluorescenci vykazoval žloutek u každého embrya, a často také dorzální aorta a její blízké okolí ($n=8$). Zdroj pozitivního signálu je ale u obou struktur nejspíše způsoben autofluorescencí, než přítomností barviva CM-DiI (Tabule 14E). Mezenchymální buňky pozitivní na signál byly pozorovány také ve hřbetní ploutvi ($n=8$) a ploutvi břišní ($n=3$) (Tabule 14F).

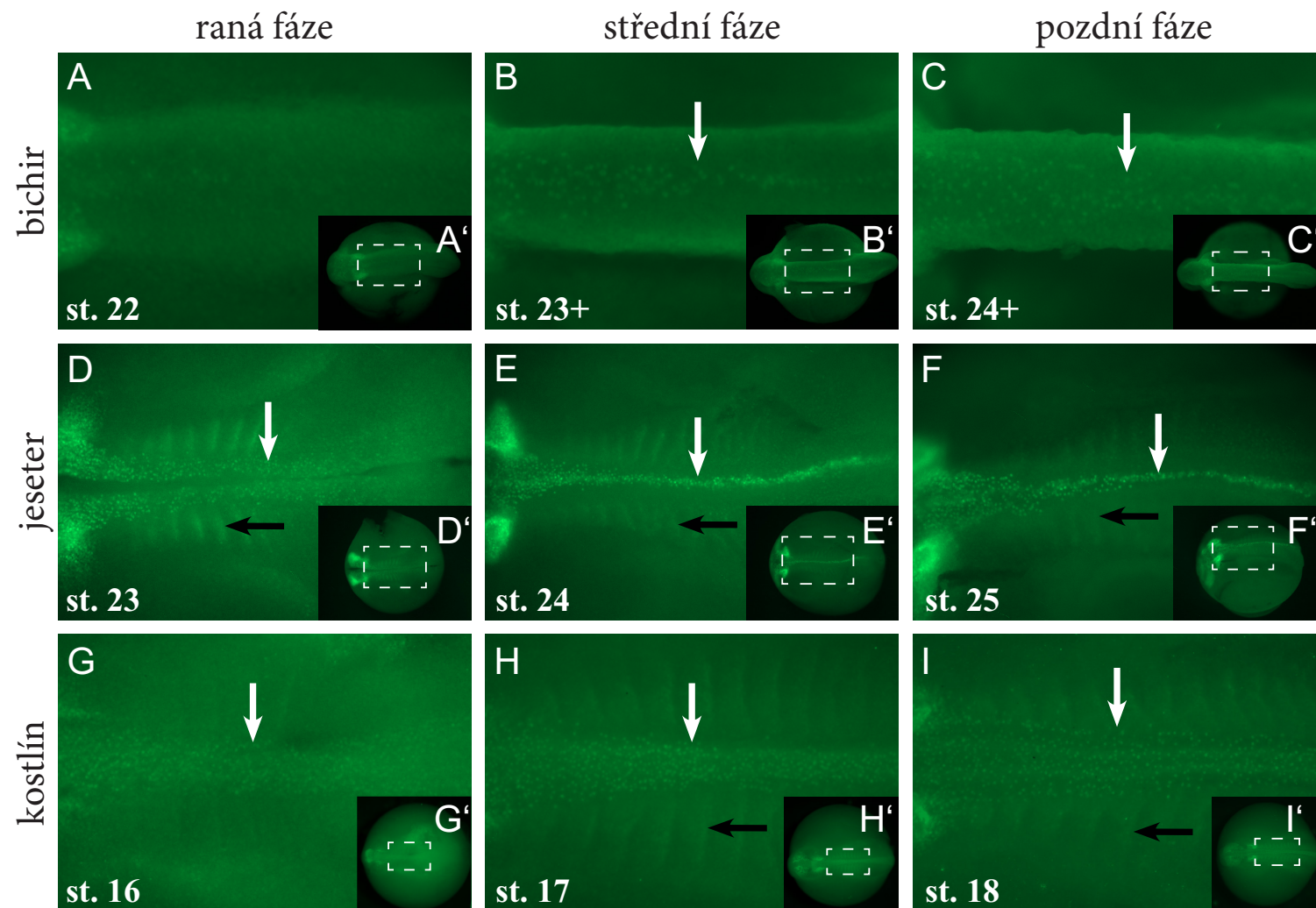
4. Tabule

Tabule 1: Celkovostní pohled na embrya studovaných druhů s expresí *Sox9* v buňkách neurální lišty. Raná (A, C, E) a pozdnější (B, D, F) exprese genu *Sox9* u bichira (A, B), jesetera (C, D) a kostlína (E, F) z dorzálního pohledu s hlavou směřující nahoru. Čerchovaná linie značí hranici mezi hlavou a trupem. Šipky ukazují vizualizovanou expresi v trupu. Tabule sestavena z dat Mgr. Jana Štundla, Ph.D.



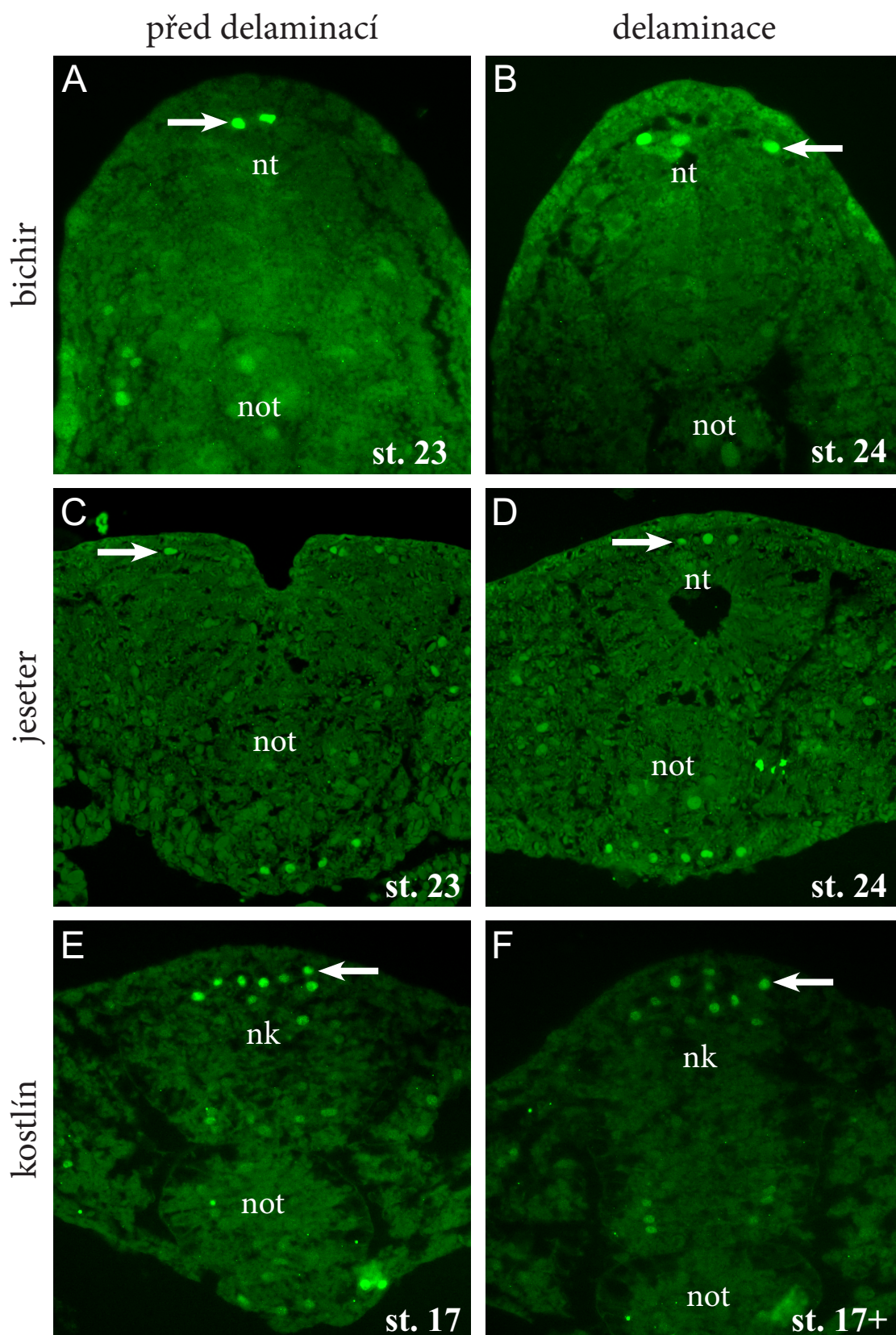
Tabule 1: Celkovostní pohled na embrya studovaných druhů s expresí *Sox9* v buňkách neurální lišty.

Tabule 2: Detailnější analýza vzniku buněk neurální lišty v trupu studovaných druhů za pomoci SOX9. Raná (A, D, G), střední (B, E, H) a pozdní (C, F, I) fáze vzniku buněk trupové neurální lišty na protilátkově barvených embryích bichira (A, B, C), jesetera (D, E, F) a kostlína (G, H, I) vůči proteinu SOX9. Snímky (A-I) zobrazují detail trupu z dorzálního pohledu s hlavou směřující doleva. Těmto snímkům odpovídá vyznačená část na celkovostním pohledu na embrya (A'-I'). Výrazný pozitivní signál v anteriorní části embrya náleží buňkám hlavové neurální lišty a značí tak rozhraní hlavy a trupu. Bílá šipka ukazuje přítomnost SOX9 v buňkách trupové neurální lišty, zatímco černá šipka ukazuje SOX9 v buňkách odlišného původu.



Tabule 2: Detailnější analýza vzniku buněk neurální lišty v trupu studovaných druhů za pomoci SOX9.

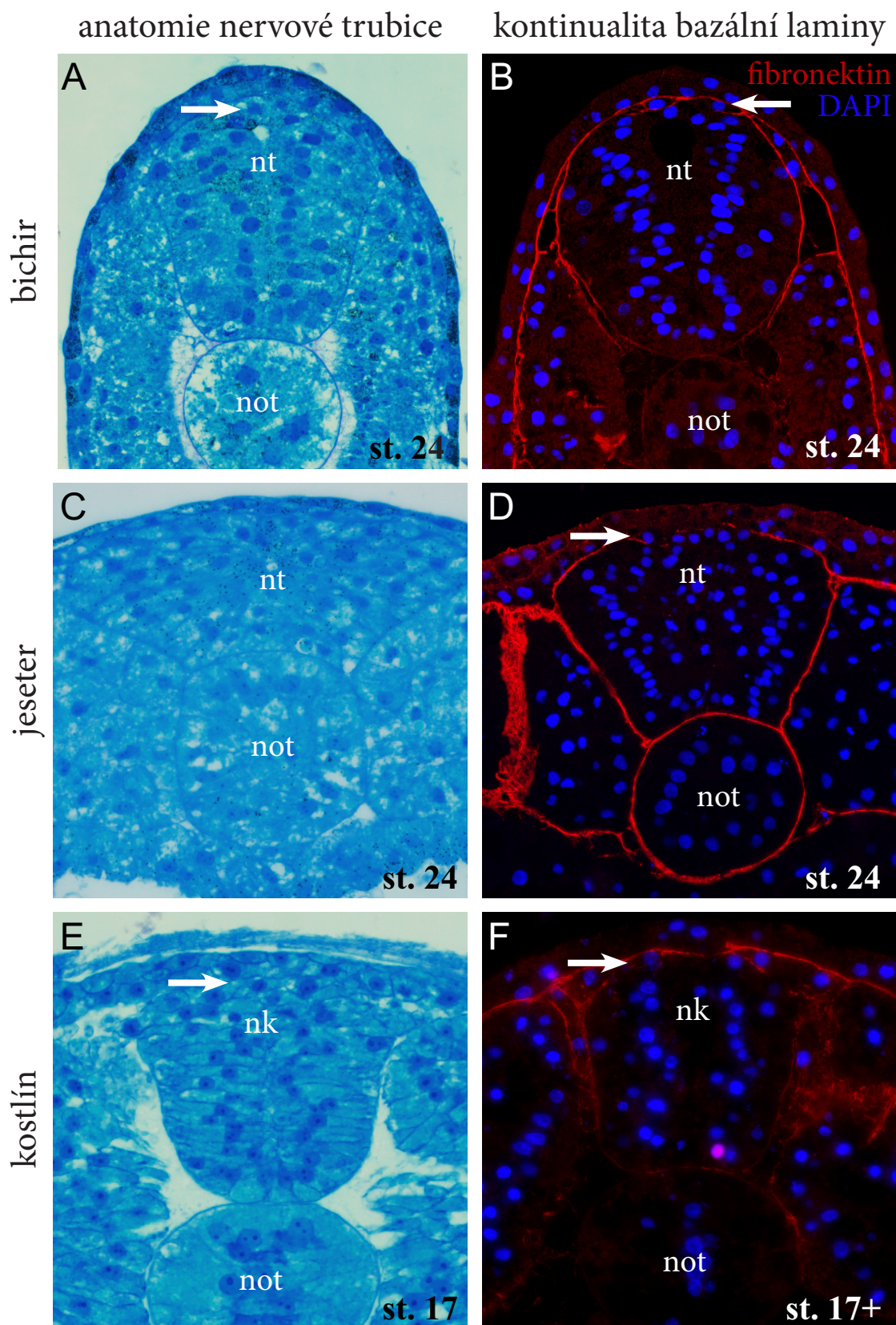
Tabule 3: Analýza dynamiky vzniku buněk trupové neurální lišty na řezech za pomoci SOX9. Transverzální řezy trupem bichira (A, B), jesetera (C, D) a kostlína (E, F) barvené protilátkově vůči SOX9 ukazují buňky trupové neurální lišty v rámci neuroektodermu (A, C, E) a v průběhu delaminace či nejranější migrace (B, D, F).
Zkratky: nk – neurální kýl; not – notochord; nt – nervová trubice.



Tabule 3: Analýza dynamiky vzniku buněk trupové neurální lišty na řezech za pomoci SOX9.

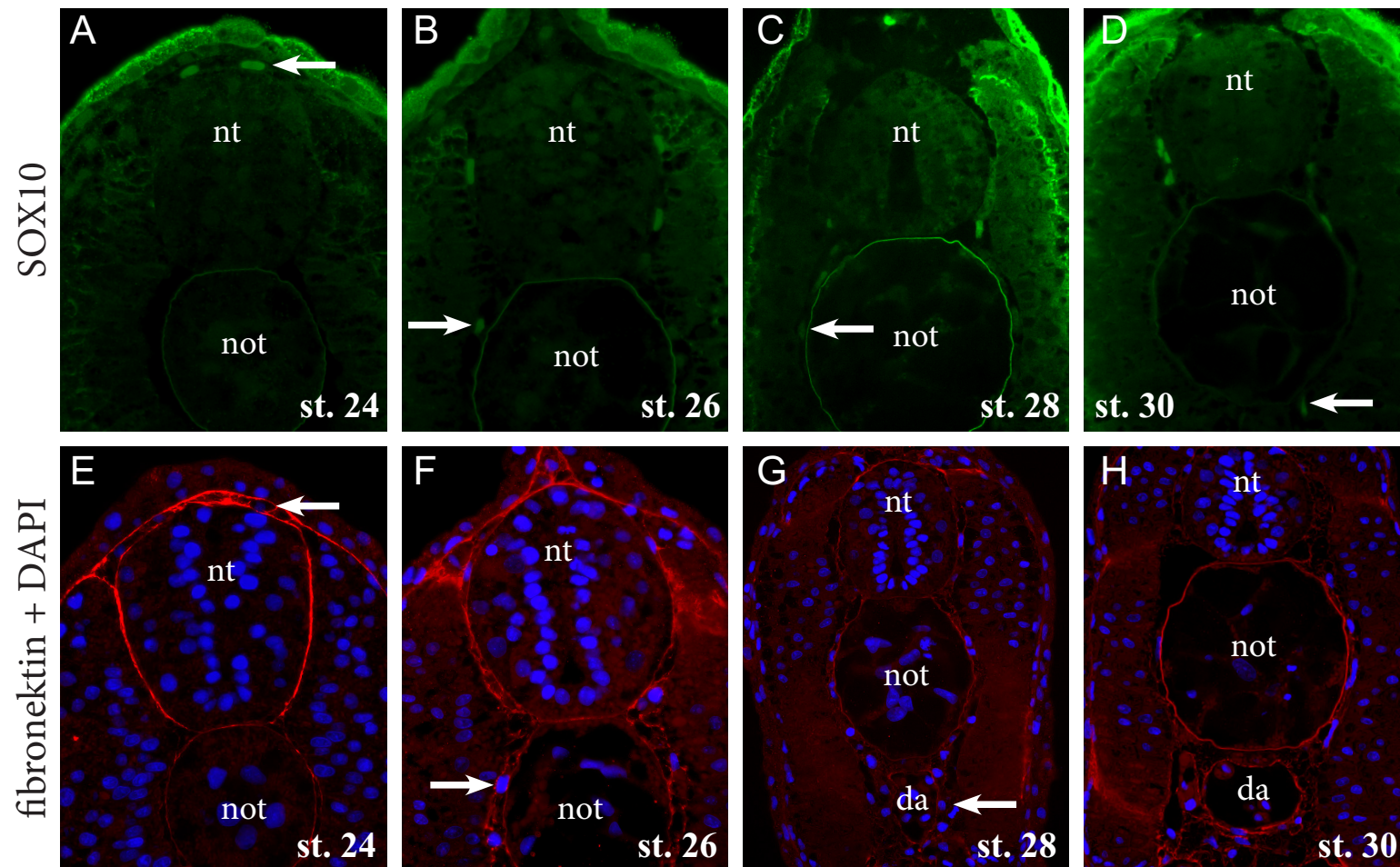
Tabule 4: Analýza anatomie neuroektodermu a kontinuity jeho bazální laminy na histologicky a protilátkově barvených řezech. Transverzální řezy ukazující anatomii nervové trubice (A, C, E) a její bazální laminu s jednotlivými buňkami (B, D, F) na bichirovi (A, B), jeseterovi (C, D) a kostlínovi (E, F). Šipky na histologicky barvených řezech (A a E) ukazují na buněčnou nesourodost v rámci neuroektodermu, na protilátkově barvených řezech (B, D, F) zase delaminující buňky neurální lišty z místa přerušit bazální laminy tohoto neuroektodermu.

Zkratky: nk – neurální kýl; not – notochord; nt – nervová trubice.



Tabule 4: Analýza anatomie neuroektodermu a kontinuity jeho bazální laminy na histologicky a protilátkově barvených řezech.

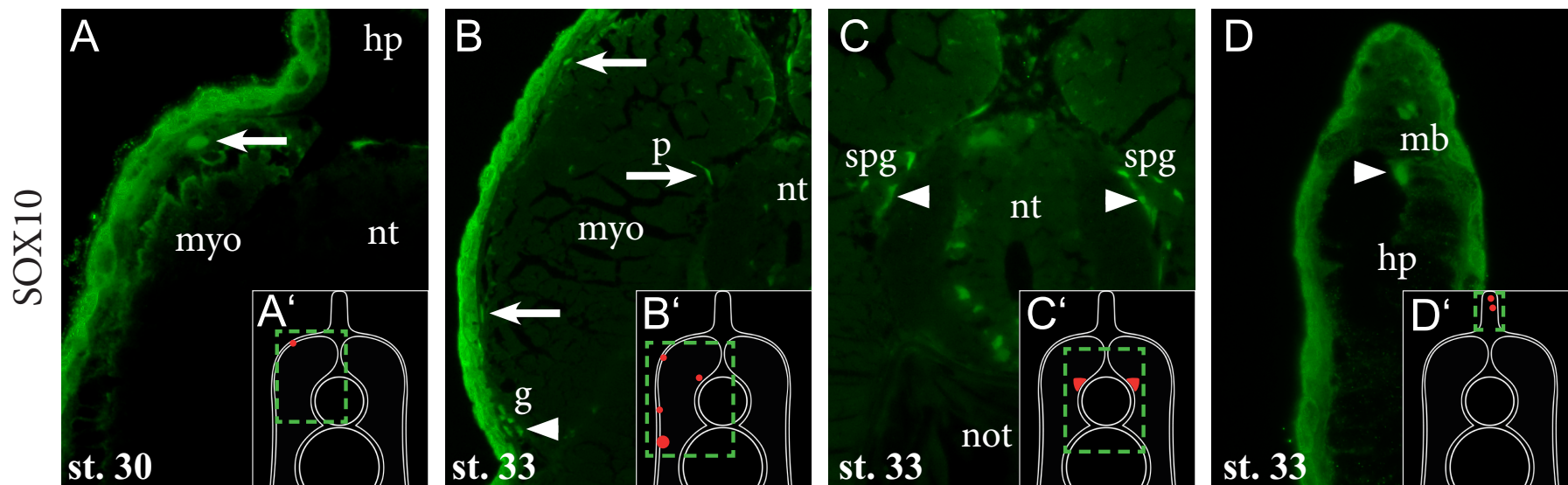
Tabule 5: Bichir – detailní analýza rané migrace buněk trupové neurální lišty na řezech. Buňky trupové neurální lišty vizualizované protilátkovým barvením vůči proteinu SOX10 (A-D), a hranice tkání s volnými buňkami vyobrazené protilátkovým barvením vůči fibronektinu a buněčným jádrům (E-H). Transverzální řezy přední třetinou trupu. Šipky (A-D) ukazují nejventrálněji migrující buňku trupové neurální lišty, zatímco šipky na (E-G) ukazují nejventrálněji pozorovanou buňku mezibuněčného prostoru. Zkratky: da – dorzální aorta; not – notochord; nt – nervová trubice.



Tabule 5: Bichir – detailní analýza rané migrace buněk trupové neurální lišty na řezech.

Tabule 6: Bichir – detailní analýza pozdní migrace buněk trupové neurální lišty na řezech. Buňky trupové neurální lišty a jejich deriváty vizualizované protilátkovým barvením vůči proteinu SOX10 na transverzálních řezech (A-D). Těmto snímkům odpovídá vyznačená část na schématickém nákresu transverzálního řezu embryem (A'-D') s červeně vyznačenými bTNL a jejich deriváty. Šipky ukazují na migrující buňky trupové neurální lišty, trojúhelníky ukazují na diferencující buňky trupové neurální lišty.

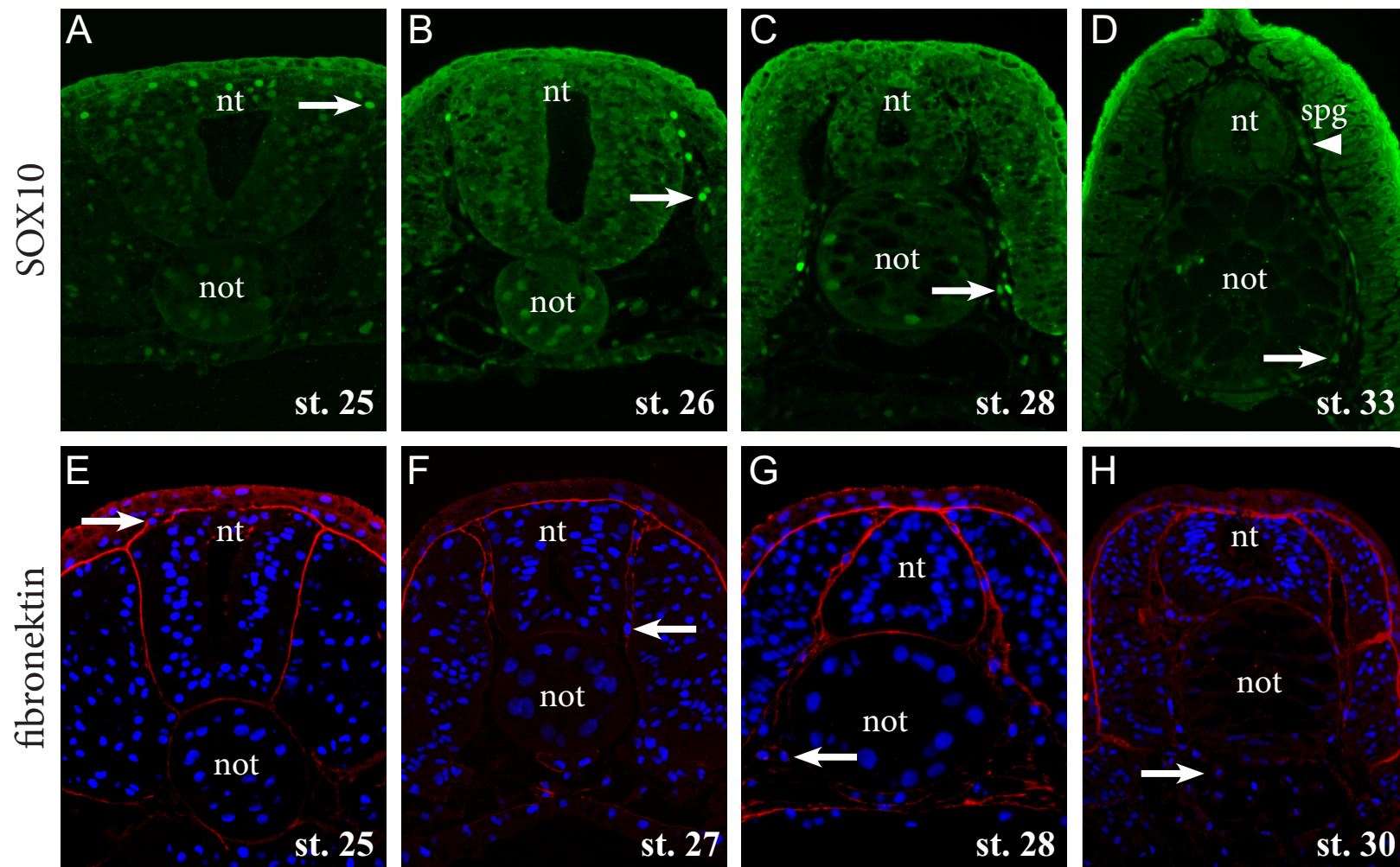
Zkratky: g – ganglion v blízkosti neuromastů; hp – hřbetní ploutvev; mb – mezenchymální buňky; myo – myotom; p – pigmentová buňka; not – notochord; nt – nervová trubice; spg – spinální ganglion.



Tabule 6: Bichir – detailní analýza pozdní migrace buněk trupové neurální lišty na řezech.

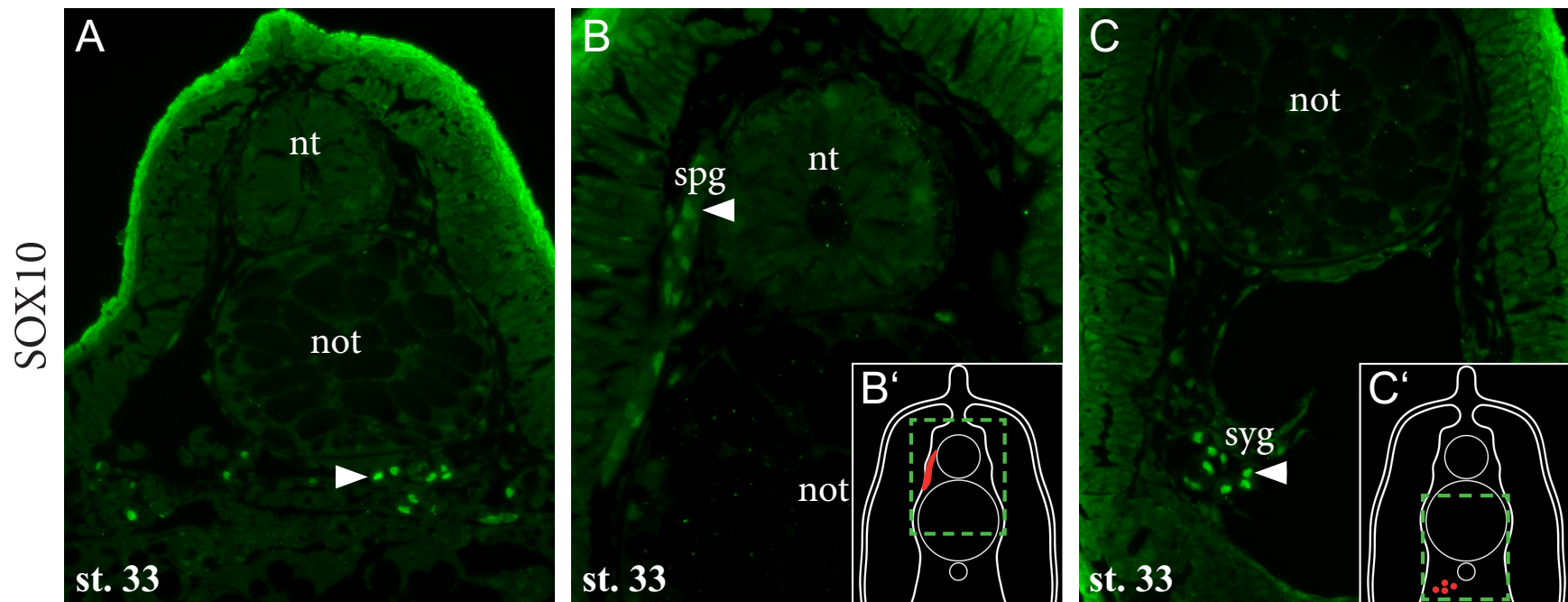
Tabule 7: Jeseter – detailní analýza rané migrace buněk trupové neurální lišty na řezech. Buňky trupové neurální lišty vizualizované protilátkovým barvením vůči proteinu SOX10 (A-D), a hranice tkání s volnými buňkami vyobrazené protilátkovým barvením vůči fibronektinu a buněčným jádrům (E-H). Transverzální řezy přední třetinou trupu. Šipky (A-D) ukazují nejventrálněji migrující buňku trupové neurální lišty, zatímco šipky na (E-H) ukazují nejventrálněji pozorovanou buňku mezibuněčného prostoru. Trojúhelník (D) ukazuje na zakládající se spinální ganglion.

Zkratky: not – notochord; nt – nervová trubice; spg – spinální ganglion.



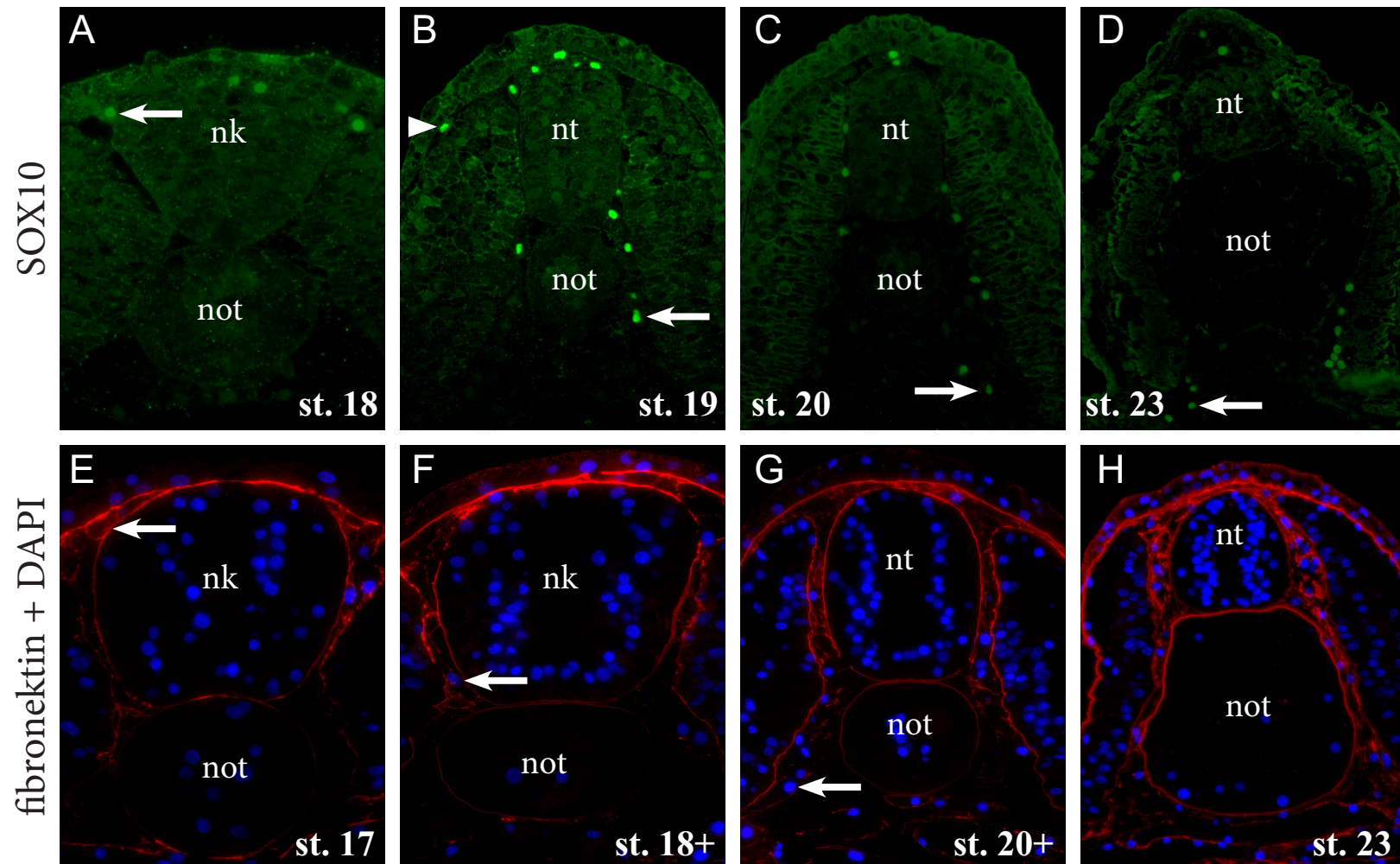
Tabule 7: Jeseter – detailní analýza rané migrace buněk trupové neurální lišty na řezech.

Tabule 8: Jeseter – detailní analýza pozdní migrace buněk trupové neurální lišty na řezech. Buňky trupové neurální lišty a jejich deriváty vizualizované protilátkovým barvením vůči proteinu SOX10 na transversálních řezech (A-C). Vyznačená část na schématickém nákresu (B', C') s červeně vyznačenými bTNL a jejich deriváty odpovídá snímku (B, C). Trojúhelníky ukazují na diferencující buňky trupové neurální lišty. Zkratky: not – notochord; nt – nervová trubice; spg – spinální ganglion; syg – sympatické ganglium.



Tabule 8: Jeseter – detailní analýza pozdní migrace buněk trupové neurální lišty na řezech.

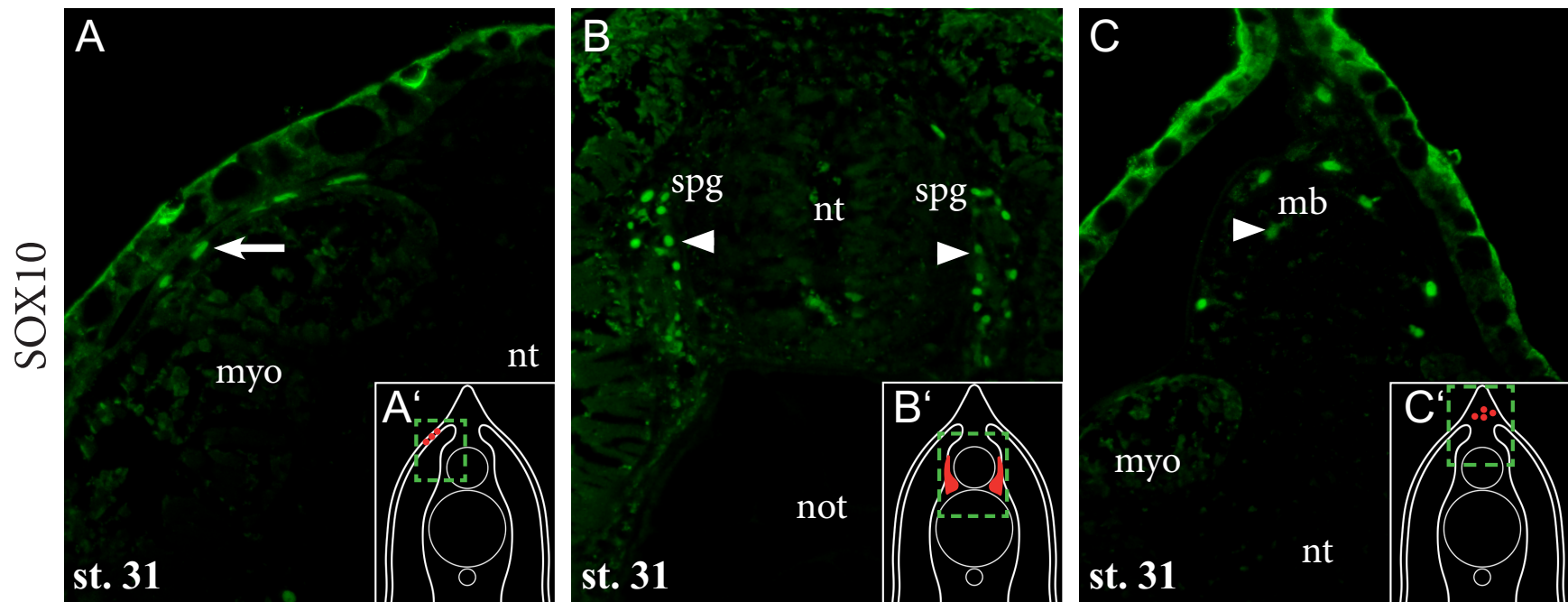
Tabule 9: Kostlín – detailní analýza rané migrace buněk trupové neurální lišty na řezech. Buňky trupové neurální lišty vizualizované protilátkovým barvením vůči proteinu SOX10 (A-D), a hranice tkání s volnými buňkami vyobrazené protilátkovým barvením vůči fibronektinu a buněčným jádrům (E-H). Transverzální řezy přední třetinou trupu. Šipky (A-D) ukazují nejventrálněji migrující buňku trupové neurální lišty, zatímco šipky (E-G) ukazují nejventrálněji pozorovanou buňku v mezibuněčném prostoru. Trojúhelník (B) ukazuje na buňku trupové neurální lišty migrující dorzo-laterální cestou. Zkratky: nk – neurální kýl; not – notochord; nt – nervová trubice.



Tabule 9: Kostlín – detailní analýza rané migrace buněk trupové neurální lišty na řezech.

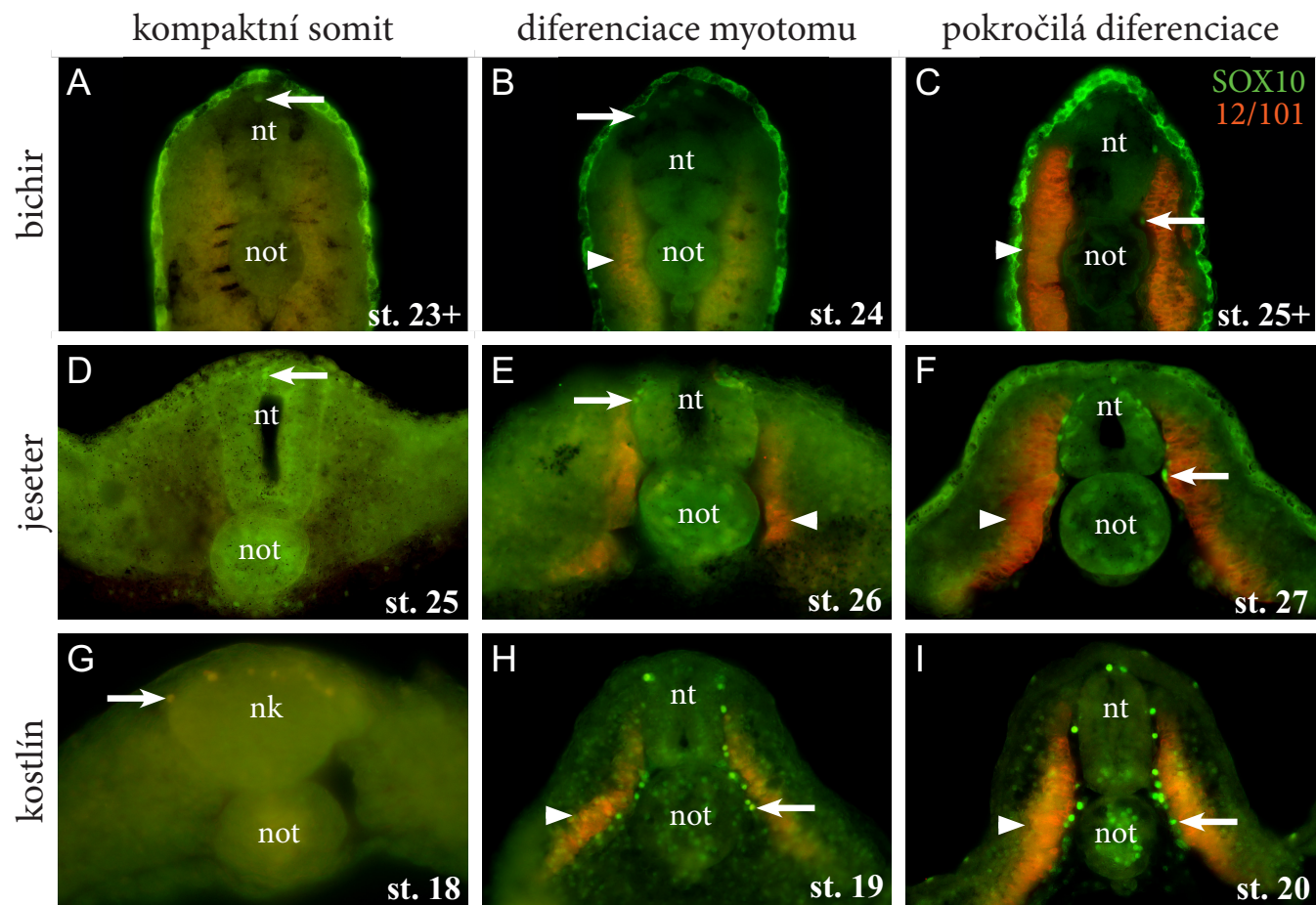
Tabule 10: Kostlín – detailní analýza pozdní migrace buněk trupové neurální lišty na řezech. Buňky trupové neurální lišty a jejich deriváty vizualizované protilátkovým barvením vůči proteinu SOX10 na transverzálních řezech (A-C). Těmto snímkům odpovídá vyznačená část na schématickém nákresu transverzálního řezu embryem (A'-C') s červeně vyznačenými bTNL a jejich deriváty. Šipky ukazují na migrující buňky trupové neurální lišty, trojúhelníky ukazují na diferencující buňky trupové neurální lišty.

Zkratky: mb – mezenychmální buňky; my – myotom; not – notochord; nt – nervová trubice; spg – spinální ganglion.



Tabule 10: Kostlín – detailní analýza pozdní migrace buněk trupové neurální lišty na řezech.

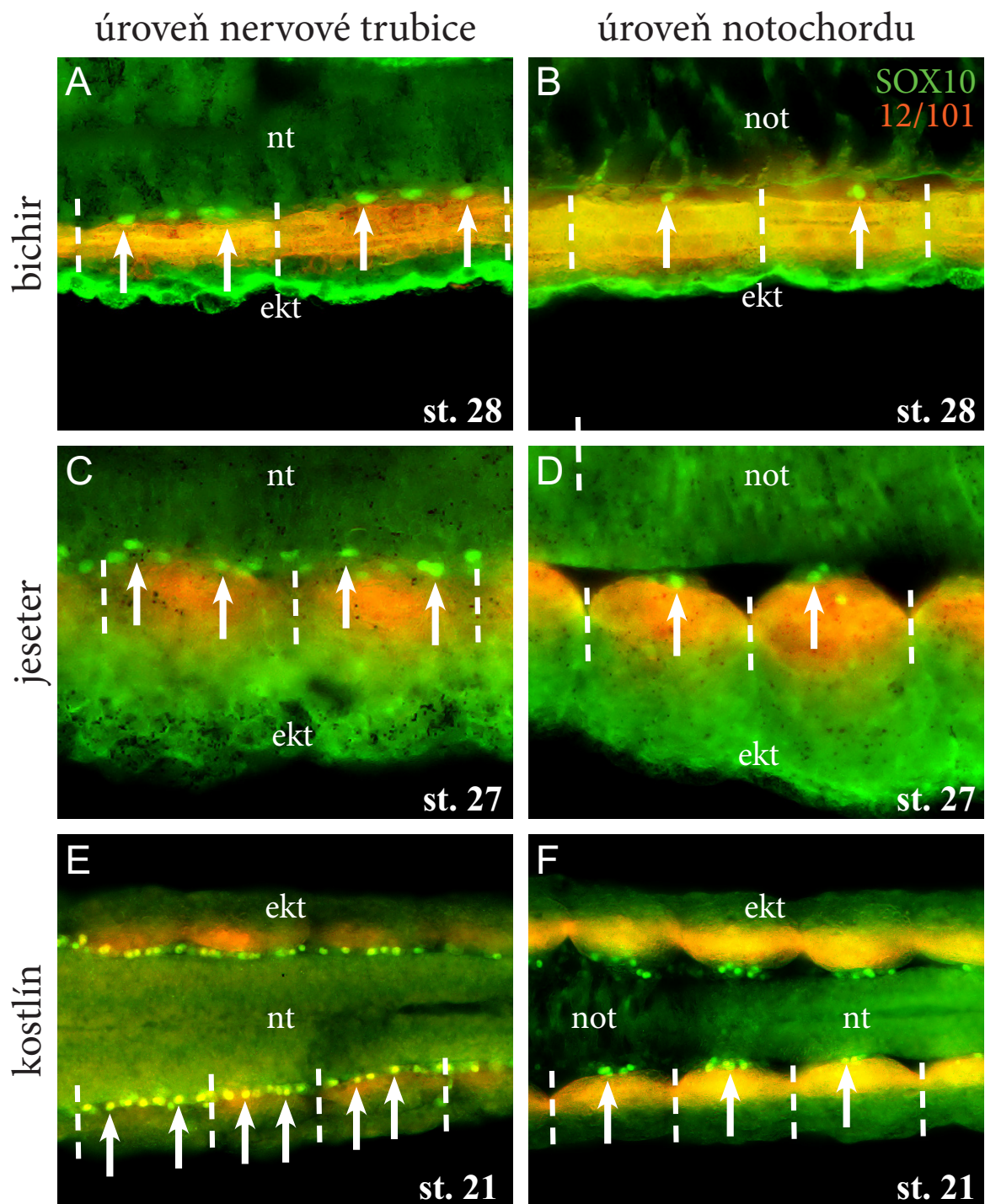
Tabule 11: Závislost migrace buněk trupové neurální lišty na úrovni diferenciace somitů u studovaných druhů. Buňky trupové neurální lišty vizualizované pomocí SOX10 a myotom pomocí markeru 12/101 ve stadiu před rozpadem somitů (A, D, G), při zahájení diferenciace myotomu (B, E, H) a v pokročilé fázi diferenciace myotomu (C, F, I). Transverzální řezy bichirem (A-C), jeseterem (D-F) a kostlínem (G-I). Šipky ukazují nejventrálněji migrující buňku trupové neurální lišty, trojúhelníky ukazují myotom. Zkratky: nk – neurální kýl; not – notochord; nt – nervová trubice.



Tabule 11: Závislost migrace buněk trupové neurální lišty na úrovni diferenciace somitů u studovaných druhů.

Tabule 12: Závislost segmentální migrace buněk trupové neurální lišty na dorzo-ventrální úrovni těla u studovaných druhů. Buňky trupové neurální lišty vizualizované pomocí SOX10 a myotom pomocí 12/101 v úrovni nervové trubice (A, C, E) a notochordu (B, D, F) u bichira (A, B), jesetera (C, D) a kostlína (E, F). Šipky ukazují na buňky trupové neurální lišty v rámci jednoho segmentu ohraničeného čerchovanými liniemi.

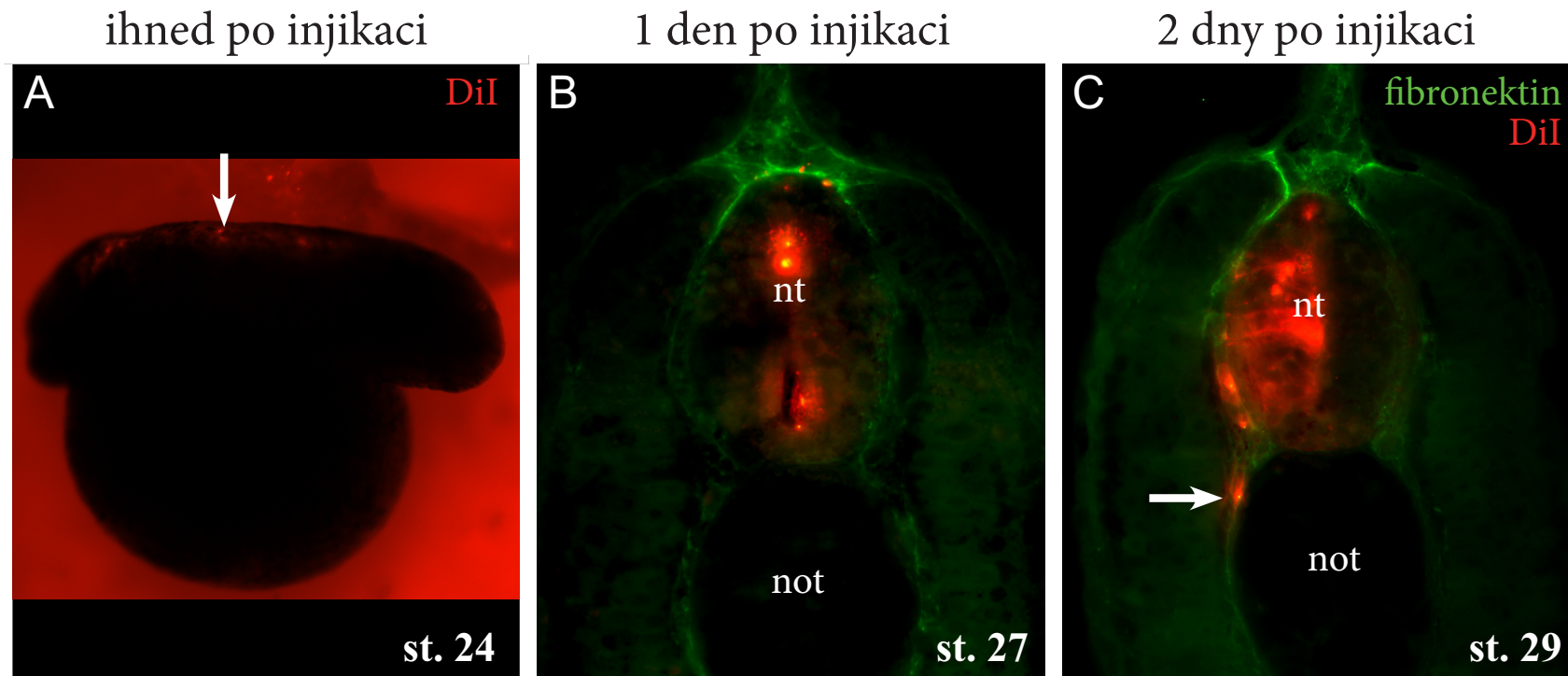
Zkratky: *ekt* – ektoderm; *not* – notochord; *nt* – nervová trubice.



Tabule 12: Závislost segmentální migrace buněk trupové neurální lišty na dorzo-ventrální úrovni těla u studovaných druhů.

Tabule 13: Bichir - experimentální značení buněk trupové neurální lišty za pomoci CM-DiI umožňující *in vivo* sledování jejich vývoje. (A) Šipka ukazuje označenou nervovou trubici s buňkami neurální lišty z laterálního pohledu na embryo s hlavou směřující doleva. (B) CM-DiI v rámci nervové trubice na transversálním řezu. (C) CM-DiI v rámci nervové trubice a v migrující buňce trupové neurální lišty označené šipkou na transversálním řezu.

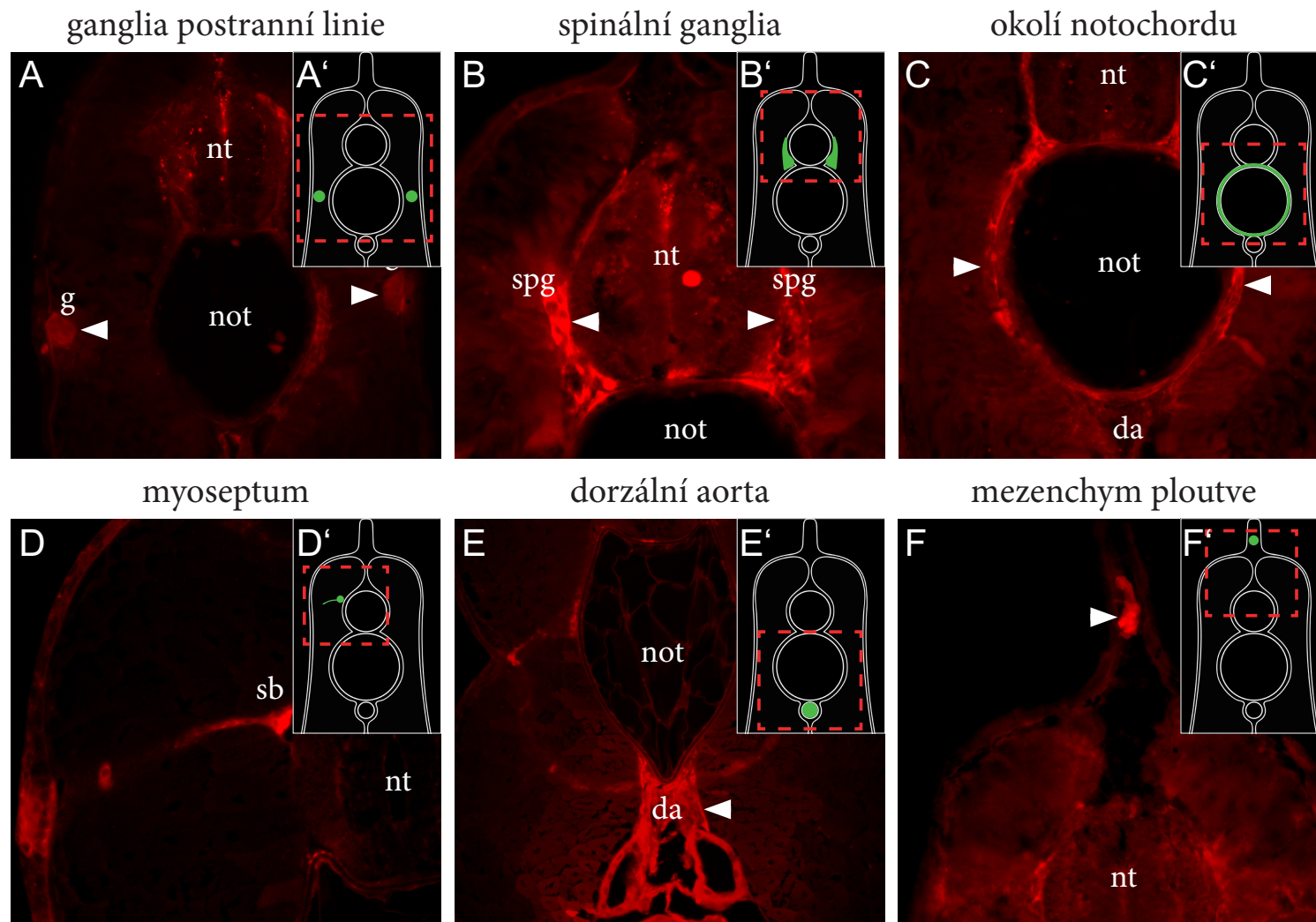
Zkratky: not – notochord; nt – nervová trubice.



Tabule 13: Bichir - experimentální značení buněk trupové neurální lišty za pomoci CM-DiI umožňující *in vivo* sledování jejich vývoje.

Tabule 14: Bichir – deriváty trupové neurální lišty zjištěné za pomoci *in vivo* značení barvivem CM-DiI na řezech. Snímky (A-F) zobrazují detail transverzálních řezů trupem bichira s pozitivním CM-DiI signálem v derivátech neurální lišty. Těmto snímkům odpovídá vyznačená část na schématickém nákresu transverzálního řezu embryem (A'-F') se zeleně vyznačeným signálem pro CM-DiI.

Zkratky: da – dorzální aorta; g – ganglion neuromastů; mb – mezenchymální buňka; not – notochord; nt – nervová trubice; sb – Schwannova buňka spg – spinální ganglion.



Tabule 14: Bichir – deriváty trupové neurální lišty zjištěné za pomoci *in vivo* značení barvivem CM-DiI na řezech.

5. Diskuze

V průběhu tvorby této diplomové práce jsem nasbíral velké množství dat o buňkách trupové neurální lišty (bTNL) u zástupců reprezentujících všechny skupiny bazálních paprskoploutvých ryb (Actinopterygii): bichir senegalský (*Polypterus senegalus*) za mnohoploutvé (Polypteriformes), jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) za chrupavčité (Chondrostei) a kostlín mexický (*Atractosteus tropicus*) za mnohokostnaté (Holostei). Zde uvedu malý výčet nejzajímavějších témat, která se vyjevila při analýze bTNL u těchto pozoruhodných druhů.

5.1 Neurulace a delaminace buněk trupové neurální lišty

Buňky neurální lišty obecně vznikají během neurulace, kdy dochází k invaginaci neuroektodermu. Neurální valy neuroektodermu posléze splývají za vzniku nervové trubice, a současně dochází k oddělení (delaminaci) buněk neurální lišty. U kostnatých (Teleostei) však dochází k neurulaci odlišným způsobem, přes tzv. neurální kýl, kdy buňky neuroektodermu formující masu buněk kavitují za vzniku nervové trubice [107, 108]. Přejídný stav mezi těmito dvěma typy neurulace lze pozorovat právě u zástupců bazálních skupin paprskoploutvých ryb [31]. U bichira probíhá neurulace klasickou invaginací neuroektodermu, u jesetera tzv. mělkou invaginací v rámci žloutkového váčku, a u kostlína poté vzniká nervová trubice skrze neurální kýl stejně jako u kostnatých [31, 102]. Chtěl jsem zjistit, zda-li se odlišný způsob neurulace u studovaných druhů promítá také na způsobu vzniku buněk neurální lišty v trupu. Získaná data jsem následně porovnal s typem neurulace u každého zástupce [31, 102]. Ukázalo se, že bTNL u bichira i jesetera delaminují z nervové trubice po splynutí neurálních valů, u kostlína zase ve stadiu, kdy dochází k zahájení kavitace neurálního kýlu v nervovou trubici. K delaminaci bTNL tak dochází přesně v čase vzniku nervové trubice, a nikoli předtím, jako ve výjimečném případě delaminace buněk hlavové neurální lišty u myši a drápatky ve stadiu stále otevřených neurálních valů [109, 110]. U kuřete bylo navíc popsáno, že delaminace bTNL je spuštěna v návaznosti na rozpad epiteliálních somitů a jejich následnou diferenciaci [40]. Toto tvrzení se potvrdilo také na mých datech, neboť bTNL delaminovaly přesně v čase rozpadu somitů, a zahájení migrace doprovázela následná diferenciací myotomů. U všech tří studovaných druhů se delaminace bTNL odehrávala konzervativně v antero-posteriorním rázu. Co se týče pozice delaminace bTNL na transverzálním řezu neuroektodermem, u všech tří druhů se odehrává mediálně na dorzální straně. U dania, které stejně jako kostlín neuruluje skrze

nerální kýl, byla však popsána delaminace odehrávající se nejprve na laterálních stranách neuroektodermu, a až později na dorzální straně v rámci další vlny migrace bTNL [63]. Jak je však patrné z mých dat u kostlína, časně delaminované bTNL je těžké rozeznat, neboť jsou stlačeny mezi ektodermem a neuroektodermem. Později při zahájení migrace na laterálních stranách neuroektodermu jsou však jasně oddělené od neuroektodermu, což takto mohlo být v případě dania interpretováno jako místo delaminace. Dále se ukázalo, že bTNL jsou u jesetera a kostlína vykazatelné v rámci neuroektodermu za pomoci SOX9 mnohem dříve před samotnou delaminací, zatímco u bichira nastává specifikace bTNL těsně před delaminací [111]. Dále mě zajímalo, jestli bTNL u zástupců bazálních skupin paprskoploutvých ryb formují v čase mezi delaminací a zahájením migrace vícevrstevnou „strunu“ na dorzální straně nervové trubice, jak byl popsáno u axolotla [54, 55]. Podobnou strukturu jsem však u studovaných druhů na transverzálních řezech nepozoroval.

Delaminace bTNL se u všech tří studovaných druhů odehrává konzervativně, a to v počátečním čase vzniku nervové trubice, podél mediální roviny na dorzální straně této vznikající nervové trubice, a v anterio-posteriorním rázu.

5.2 Migrace buněk trupové neurální lišty

Po delaminaci začínají bTNL z místa svého vzniku migrovat, aby se dostaly na požadované místo, kde dají vznik některému ze svých derivátů. Během migrace jsou však bTNL ovlivňovány signalizací z okolních buněk a tkání [25, 112]. V reakci na tyto signály poté mohou migrovat třemi obecnými cestami: ventro-mediální mezi nervovou trubicí s notochordem a somity; ventro-laterální skrze anteriorní polovinu sklerotomů; a dorzo-laterální mezi ektodermem a somity [34, 41]. Cesty užívané k migraci stejně jako jejich časová posloupnost se liší mezi jednotlivými skupinami obratlovců, ne-li dokonce druh od druhu. U myši začínají bTNL migrovat ventro-laterální i dorzo-laterální cestou v jeden okamžik, zatímco u kuřete migrují bTNL nejdříve ventro-laterálně, později až vstupují na dorzo-laterální cestu [47, 50, 49]. U axolotla bTNL migrují nejprve dorzo-laterální, a až později ventro-mediální cestou, bTNL dania naproti tomu nejdříve ventro-mediální, a posléze dorzo-laterální cestou [55, 63]. Jak se ukazuje na mých datech, bTNL u všech tří studovaných druhů nejdříve vstupují na ventro-mediální cestu, kudy migrují až k oblasti dorzální aorty. U kostlína se navíc několik málo bTNL usazuje v prostoru nad nervovou trubicí a výjimečně mohou individuální buňky migrovat i dorzo-laterální cestou. V čase stále probíhající ventro-mediální migrace se u bichira a kostlína usazují bTNL v mezenchymu hřbetní ploutve.

U myši a kuřete vstupují bTNL při ventro-mediální migraci do anterorní poloviny sklerotomů, což vede k segmentaci migrujících proudů bTNL po anterio-posteriorní ose [47, 50, 51, 113]. Nicméně se ukázalo, že u mnou studovaných druhů tvoří většinu původního somitu myotom, na rozdíl od myši. Stejně tak u dania tvoří většinu původního somitu myotom, zatímco sklerotom se vyskytuje ventrálně pod myotomem a v porovnání s myotomem tvoří jen malou část [64]. I přes nepřítomnost sklerotomu podél ventro-

mediální cesty migrace však dochází u dania k segmentaci migrace po antero-posterioní ose, a to v úrovni mezi nervovou trubicí a notochordem [63]. Segmentální migrace bTNL může být následkem signalizace nikoli buněk sklerotomu, nýbrž myotomu, a to také u blannatých obratlovců včetně myši a kuřete [67]. U dania se ukázalo, že tuto segmentální migraci patrně určují myotomální buňky pomalého svalstva [66]. Nicméně buňky sklerotomu ze své ventrální pozice migrují dorzálně po ventro-mediální cestě až k nervové trubicí [64, 65]. Segmentální migrace bTNL tak nakonec může být opravdu ovlivněna buňkami sklerotomu, jež se setkávají s migrujícími bTNL na ventro-mediální cestě. To navíc znamená, že pozorované mezenchymatické buňky v extracelulárním prostoru podél ventro-mediální cesty nemusí nutně představovat buňky neurální lišty, nýbrž také buňky sklerotomu. U mnou studovaných druhů jsem také pozoroval segmentální migraci bTNL po antero-posterioní ose. U všech tří z nich bTNL delaminují a následně zahajují migraci ventro-mediální cestou v nesegmentované formě. V úrovni mezi nervovou trubicí a notochordem se však bTNL začínají shlukovat doprostřed délky somitů, a ventrálně již migrují segmentovaně po antero-posterioní ose. Segmentace těchto buněk nastává právě v místě, kde u dania začíná dorzální vrchol sklerotomu [64].

Později, kdy však migrace ventro-mediální cestou stále probíhá, bTNL u bichira a kostlína začínají migrovat také dorzo-laterální cestou, avšak v menším množství v porovnání s ventro-mediální migrací. Migrují jednotlivě, a u kostlína navíc byla pozorována i migrace ve formaci řetízku. U jesetera jsem migraci dorzo-laterální cestou nepozoroval, a nejspíš se tak děje až v pozdějších vývojových stádiích. Souhrnem, bTNL u všech tří studovaných druhů začínají migrovat ventro-mediální cestou a v nesegmentované formě. V úrovni mezi nervovou trubicí a notochordem se shlukují vprostřed délky jednotlivých somitů, a dále migrují ventrálně v segmentované formě až k oblasti dorzální aorty. U bichira a kostlína se bTNL shromažďují také v mezenchymu hřbetní ploutve, a později u obou dvou druhů migrují bTNL také dorzo-laterální cestou, ač v malé míře.

5.3 Deriváty trupové neurální lišty

Když bTNL domigrují na své místo určení, diferencují v jeden ze svých derivátů, jimiž mohou být spinální ganglia, buňky enterického nervového systému, melanocyty, chromaffiní buňky dřeně nadledvin, Schwannovy buňky, sympatická ganglia či několik dalších, zejména neurálních derivátů [28]. U mnou zkoumaných druhů jsem pozoroval časné deriváty trupové neurální, a to jednak za pomoci protilátkového barvení vůči SOX10 u všech tří studovaných druhů, a jednak za pomoci barviva CM-DiI u experimentálních embryí bichira. U všech zkoumaných druhů tvořily bTNL shluky uložené v páru laterálně od nervové trubice, představující zakládající se spinální ganglia. Na řezech experimentálními embryi bichira pozdějšího stadia vývoje poté tyto útvary přesně odpovídají svou pozicí i tvarem spinálním gangliím pozorovaným u dania [69]. Dále jsem u bichira a kostlína pozoroval buňky migrující dorzo-laterální cestou. Jak je známo, buňky migrující touto cestou dávají vzniknout pigmentovým buňkám. Nicméně i bTNL migrující ventro-mediální cestou, mo-

hou dát vznik pigmentovým buňkám. Ty pro migraci využívají periferních nervů, ať už v případě prekursorů Schwannových buněk či jednotlivých bTNL migrujících myosepty, a posléze dávají vznik pigmentovým buňkám [114, 105]. Dále jsem pozoroval bTNL také v mezenchymu hřbetní ploutve jak u bichira, tak i kostlína. U bichira se tato data potvrdila také na experimentálně značených embryích. Přítomnost bTNL ve hřbetní ploutvi byla dříve popsána u axolotla a dania [55, 56, 72]. Ačkoli jejich funkci nikdo nekomentoval, bylo popřeno, že by zde bTNL tvořily mezenchym či skeletální tkáň [57, 73, 74]. Možné vysvětlení přinesly až výsledky studií provedených na platýsovcích. V nich se tvrdí, že bTNL využívají mezenchym hřbetní ploutve jako dočasné místo setrvání do pozdějších vývojových stádiích, kdy opět migrují a na to diferencují v adultní typ pigmentových buněk [75, 76]. Jelikož u jesetera nebyly bTNL pozorovány při dorzo-laterální migraci a ani v mezenchymu hřbetní ploutve, zdá se, že jeho pigmentace je omezena na pozdější vývojová stadia, nebo většina pigmentových buněk vzniká právě z prekursorů Schwannových buněk migrujících ventro-mediálně [114]. Dále jsem u bichira pozoroval subepidermální shluky bTNL v úrovni notochordu po dorzo-ventrální ose, a to jak na protilátkově, tak i experimentálně barvených embryích. Z pozice těchto shluků se zdá, že by se mohlo jednat o glie neuromastů postranní linie. Ty vznikají u dania, axolotla a žralůčka skvrnitého (*Chiloscyllium punctatum*) právě z bTNL, ač samotné neuromasty jsou odvozeny od plakody postranní linie, mimo jiné tvořící v hlavové oblasti také elektrické orgány [71, 55, 115, 116, 117]. U bichira jsem dále pozoroval bTNL v prostoru myosept jak na protilátkově, tak i experimentálně barvených embryích, a také v těsném okolí notochordu u experimentálních jedinců. Tyto bTNL jsou ve spojení s periferními nervy, po kterých migrují, a později ve vývoji tvoří také adultní typ pigmentových buněk [105]. U experimentálních embryích bichira téměř vždy vykazovala pozitivní signál také dorzální aorta a její okolí. Nicméně soudím, že tento signál pochází z autofluorescence endodermu, ze kterého jsou hypoderm, a následně i dorzální aorta odvozeny [118]. S výjimkou jesetera jsem nepozoroval žádný buněčný útvar v blízkosti dorzální aorty, jenž by mohl představovat splinální ganglia. Buďto mohou vznikat až během pozdějších stádií vývoje, nebo rané diferenciací přestávají exprimovat *Sox10*.

6. Závěr

Předložená diplomová práce obsahuje poznatky o vzniku, migraci a rané diferenciaci buněk trupové neurální lišty u vybraných zástupců bazálních skupin paprskoploutvých ryb: bichira (*Polypterus senegalus*), jesetera (*Acipenser ruthenus*) a kostlína (*Atractosteus tropicus*). Práce obsahuje také data o derivátech trupové neurální lišty bichira z experimentálního značení pomocí barviva CM-DiI.

Výsledky ukazují na obecné schéma vzniku a migrace bTNL mezi studovanými druhy, i přes druhově specifické variace u jednotlivých zástupců. U všech třech druhů ryb vznikají bTNL podél mediální osy trupu, v dorzální části neuroektodermu. U bichira a jesetera bTNL delaminují po spojení neurálních valů za vzniku nervové trubice, zatímco u kostlína delaminují při zahájení kavitace neurálního kýlu v nervovou trubici. Delaminace u všech zástupců probíhá v antero-posteriorním rázu, a je průvodní s časem rozpadu epiteliálních somitů. Následně bTNL vstupují na ventro-mediální cestu, kudy migrují k oblasti ventrální strany notochordu a dorzální aortě. U kostlína mohou v malém míře bTNL při zahájení migrace putovat také dorzo-laterální cestou, a několik jich zůstává v prostoru mezi nervovou trubicí a ektodermem. Při ventro-mediální migraci dochází na rozhraní nervové trubice a notochordu k antero-posteriorní segmentaci migrujících buněk. Proudění bTNL jsou uspořádány segmentovaně vprostřed délky jednotlivých segmentů, tvořenými zejména myotomy. V pozdějších stádiích vývoje, kdy již není pozorována migrace ventro-mediální cestou, vstupují bTNL u bichira a kostlína na dorzo-laterální cestu. V průběhu stále probíhající migrace dochází u všech tří druhů k formaci spinálních ganglií. U bichira i kostlína jsou bTNL přítomny navíc v mezenchymu hřbetní ploutve, zatímco u jesetera dochází k formaci sympatických ganglií. U bichira byla pozorována také migrace bTNL prostorem myosept a diferenciace bTNL v glie neuromastů. Tyto mezidruhové rozdíly vznikají pravděpodobně následkem heterochronie a v pozdějších vývojových stádiích dochází zřejmě k jejich setření. Na experimentálně značených embryích bichira se potvrdila přítomnost bTNL ve spinálních gangliích, v gangliích neuromastů, v mezenchymu hřbetní ploutve, a také v podobě Schwannovy buňky v prostoru myosept. Nadto byl pozitivní signál vykazující bTNL pozorován také v těsném spojení s okolím notochordu.

Ač se mi nepodařilo vyřešit ultimátní otázku o skeletogenním potenciálu trupové neurální lišty bichira, vyjevil jsem jako první poznatky o biologii buněk trupové neurální lišty u zástupců bazálních skupin paprskoploutvých ryb. Otázkou potenciální skeletogenní aktivity trupové neurální lišty se budu zabývat nadále v rámci doktorského studia.

7. Literatura

- [1] Nicole Le Douarin and Chaya Kalcheim. *The Neural Crest*. Developmental and Cell Biology Series. Cambridge University Press, 2 edition, 1999.
- [2] Brian K Hall. *The neural crest and neural crest cells in vertebrate development and evolution*, volume 11. Springer Science & Business Media, 2 edition, 2008.
- [3] Brian K Hall. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evolution & Development*, 2(1):3–5, 2000.
- [4] Matthew K Vickaryous and Brian K Hall. Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. *Biological Reviews*, 81(3):425–455, 2006.
- [5] Arianna Baggiolini, Sandra Varum, José María Mateos, Damiano Bettosini, Nesy John, Mario Bonalli, Urs Ziegler, Leda Dimou, Hans Clevers, Reinhard Furrer, et al. Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. *Cell stem cell*, 16(3):314–322, 2015.
- [6] Antoine Zalc, Rahul Sinha, Gunsagar S Gulati, Daniel J Wesche, Patrycja Daszczyk, Tomek Swigut, Irving L Weissman, and Joanna Wysocka. Reactivation of the pluripotency program precedes formation of the cranial neural crest. *Science*, 371(6529), 2021.
- [7] Ruslan Soldatov, Marketa Kaucka, Maria Eleni Kastriti, Julian Petersen, Tatiana Chontorotzea, Lukas Englmaier, Natalia Akkuratova, Yunshi Yang, Martin Häring, Viacheslav Dyachuk, et al. Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science*, 364(6444), 2019.
- [8] Tatjana Sauka-Spengler and Marianne Bronner-Fraser. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(7):557–568, 2008.
- [9] Megan L Martik and Marianne E Bronner. Regulatory logic underlying diversification of the neural crest. *Trends in Genetics*, 33(10):715–727, 2017.
- [10] T Shawn Sato, Atsuhiko Handa, Sarv Priya, Pankaj Watal, Robert M Becker, and Yutaka Sato. Neurocristopathies: Enigmatic appearances of neural crest cell-derived abnormalities. *RadioGraphics*, 39(7):2085–2102, 2019.
- [11] Guillermo A Vega-Lopez, Santiago Cerrizuela, Celeste Tribulo, and Manuel J Aybar. Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. *Developmental Biology*, 444:S110–S143, 2018.
- [12] R Glenn Northcutt. The new head hypothesis revisited. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 304(4):274–297, 2005.

-
- [13] Stephen A Green, Marcos Simoes-Costa, and Marianne E Bronner. Evolution of vertebrates as viewed from the crest. *Nature*, 520(7548):474–482, 2015.
- [14] Jr-Kai Yu, Daniel Meulemans, Sonja J McKeown, and Marianne Bronner-Fraser. Insights from the amphioxus genome on the origin of vertebrate neural crest. *Genome research*, 18(7):1127–1132, 2008.
- [15] Evgeniy Ivashkin and Igor Adameyko. Progenitors of the protochordate ocellus as an evolutionary origin of the neural crest. *EvoDevo*, 4(1):1–15, 2013.
- [16] Frédéric Delsuc, Henner Brinkmann, Daniel Chourrout, and Hervé Philippe. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, 439(7079):965–968, 2006.
- [17] William R Jeffery, Allen G Strickler, and Yoshiyuki Yamamoto. Migratory neural crest-like cells form body pigmentation in a urochordate embryo. *Nature*, 431(7009):696–699, 2004.
- [18] Philip Barron Abitua, Eileen Wagner, Ignacio A Navarrete, and Michael Levine. Identification of a rudimentary neural crest in a non-vertebrate chordate. *Nature*, 492(7427):104–107, 2012.
- [19] Alberto Stolfi, Kerriane Ryan, Ian A Meinertzhagen, and Lionel Christiaen. Migratory neuronal progenitors arise from the neural plate borders in tunicates. *Nature*, 527(7578):371–374, 2015.
- [20] Jan Stundl, Paola Y Bertucci, Antonella Lauri, Detlev Arendt, and Marianne E Bronner. Evolution of new cell types at the lateral neural border. *Current Topics in Developmental Biology*, 141:173–205, 2021.
- [21] Ryoko Horie, Alex Hazbun, Kai Chen, Chen Cao, Michael Levine, and Takeo Horie. Shared evolutionary origin of vertebrate neural crest and cranial placodes. *Nature*, 560(7717):228–232, 2018.
- [22] Philip CJ Donoghue, Anthony Graham, and Robert N Kelsh. The origin and evolution of the neural crest. *Bioessays*, 30(6):530–541, 2008.
- [23] Megan L Martik, Shashank Gandhi, Benjamin R Uy, J Andrew Gillis, Stephen A Green, Marcos Simoes-Costa, and Marianne E Bronner. Evolution of the new head by gradual acquisition of neural crest regulatory circuits. *Nature*, 574(7780):675–678, 2019.
- [24] Megan Rothstein, Debadrita Bhattacharya, and Marcos Simoes-Costa. The molecular basis of neural crest axial identity. *Developmental Biology*, 444:S170–S180, 2018.
- [25] András Szabó and Roberto Mayor. Mechanisms of neural crest migration. *Annual review of genetics*, 52:43–63, 2018.
- [26] Robert D Knight and Thomas F Schilling. Cranial neural crest and development of the head skeleton. *Neural crest induction and differentiation*, pages 120–133, 2006.
- [27] Paul Kulesa, Debra L Ellies, and Paul A Trainor. Comparative analysis of neural crest cell death, migration, and function during vertebrate embryogenesis. *Developmental Dynamics*, 229(1):14–29, 2004.

- [28] Fabio Santagati and Filippo M Rijli. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(10):806–818, 2003.
- [29] Robert Cerny, Daniel Meulemans, Jürgen Berger, Michaela Wilsch-Bräuninger, Thomas Kurth, Marianne Bronner-Fraser, and Hans-Henning Epperlein. Combined intrinsic and extrinsic influences pattern cranial neural crest migration and pharyngeal arch morphogenesis in axolotl. *Developmental Biology*, 266(2):252–269, 2004.
- [30] Mary Cathleen McKinney, Rebecca McLennan, Rasa Giniunaite, Ruth E Baker, Philip K Maini, Hans G Othmer, and Paul M Kulesa. Visualizing mesoderm and neural crest cell dynamics during chick head morphogenesis. *Developmental Biology*, 461(2):184–196, 2020.
- [31] Jan Stundl, Anna Pospisilova, Tereza Matějková, Martin Psenicka, Marianne E Bronner, and Robert Cerny. Migratory patterns and evolutionary plasticity of cranial neural crest cells in ray-finned fishes. *Developmental Biology*, 467(1-2):14–29, 2020.
- [32] Manuel Rocha, Anastasia Beiriger, Elaine E Kushkowski, Tetsuto Miyashita, Noor Singh, Vishruth Venkataraman, and Victoria E Prince. From head to tail: regionalization of the neural crest. *Development*, 147(20), 2020.
- [33] Jo Richardson, Anton Gauert, Luis Briones Montecinos, Lucía Fanlo, Zainalabdeen Mohmammed Alhashem, Rodrigo Assar, Elisa Marti, Alexandre Kabla, Steffen Härtel, and Claudia Linker. Leader cells define directionality of trunk, but not cranial, neural crest cell migration. *Cell reports*, 15(9):2076–2088, 2016.
- [34] Guillermo A Vega-Lopez, Santiago Cerrizuela, and Manuel J Aybar. Trunk neural crest cells: formation, migration and beyond. *International Journal of Developmental Biology*, 61(1-2):5–15, 2017.
- [35] Shigeru Kuratani, Rie Kusakabe, and Tatsuya Hirasawa. The neural crest and evolution of the head/trunk interface in vertebrates. *Developmental Biology*, 444:S60–S66, 2018.
- [36] Erica J Hutchins, Ezgi Kunttas, Michael L Piacentino, Aubrey GA Howard IV, Marianne E Bronner, and Rosa A Uribe. Migration and diversification of the vagal neural crest. *Developmental Biology*, 444:S98–S109, 2018.
- [37] Bryan R Kuo and Carol A Erickson. Vagal neural crest cell migratory behavior: a transition between the cranial and trunk crest. *Developmental Dynamics*, 240(9):2084–2100, 2011.
- [38] Marcos Simoes-Costa and Marianne E Bronner. Reprogramming of avian neural crest axial identity and cell fate. *Science*, 352(6293):1570–1573, 2016.
- [39] Shashank Gandhi, Max Ezin, and Marianne E Bronner. Reprogramming axial level identity to rescue neural-crest-related congenital heart defects. *Developmental Cell*, 53(3):300–315, 2020.
- [40] Dalit Sela-Donenfeld and Chaya Kalcheim. Inhibition of noggin expression in the dorsal neural tube by somitogenesis: a mechanism for coordinating the timing of neural crest emigration. *Development*, 127(22):4845–4854, 2000.

-
- [41] Céline Delloye-Bourgeois and Valérie Castellani. Hijacking of embryonic programs by neural crest-derived neuroblastoma: From physiological migration to metastatic dissemination. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12:52, 2019.
- [42] Scott F. Gilbert and Michael J. F. Baressi. *Developmental biology*. Sinauer Associates, 11 edition, 2016.
- [43] Laura S Gammill and Julaine Roffers-Agarwal. Division of labor during trunk neural crest development. *Developmental Biology*, 344(2):555–565, 2010.
- [44] Yuwei Li, Felipe M Viceli, Walter G Gonzalez, Ang Li, Weiyi Tang, Carlos Lois, and Marianne E Bronner. In vivo quantitative imaging provides insights into trunk neural crest migration. *Cell reports*, 26(6):1489–1500, 2019.
- [45] Chaya Kalcheim. Regulation of trunk myogenesis by the neural crest: a new facet of neural crest-somite interactions. *Developmental Cell*, 21(2):187–188, 2011.
- [46] CA Erickson and JA Weston. An SEM analysis of neural crest migration in the mouse. *Development*, 74(1):97–118, 1983.
- [47] George N Serbedzija, Scott E Fraser, and Marianne Bronner-Fraser. Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. *Development*, 108(4):605–612, 1990.
- [48] George N Serbedzija, Marianne Bronner-Fraser, and Scott E Fraser. Developmental potential of trunk neural crest cells in the mouse. *Development*, 120(7):1709–1718, 1994.
- [49] Dion Giovannone, Blanca Ortega, Michelle Reyes, Nancy El-Ghali, Maes Rabadi, Sothy Sao, and Maria Elena de Bellard. Chicken trunk neural crest migration visualized with HNK1. *Acta histochemica*, 117(3):255–266, 2015.
- [50] Marianne Bronner-Fraser. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Developmental Biology*, 115(1):44–55, 1986.
- [51] Catherine E Krull, Rusty Lansford, Nicholas W Gale, Andres Collazo, Christophe Marcelle, George D Yancopoulos, Scott E Fraser, and Marianne Bronner-Fraser. Interactions of eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Current Biology*, 7(8):571–580, 1997.
- [52] George N. Serbedzija, Marianne Bronner-Fraser, and Scott E. Fraser. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development*, 106(4):809–816, 1989.
- [53] Marianne Bronner-Fraser and Scott Fraser. Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ. *Neuron*, 3(6):755–766, 1989.
- [54] Hans-Henning Epperlein and Jan Löfberg. What insights into the phenomena of cell fate determination and cell migration has the study of the urodele neural crest provided? *International Journal of Developmental Biology*, 40(4):695–707, 2004.
- [55] Hans-Henning Epperlein, Mark AJ Selleck, Daniel Meulemans, Levan Mchedlishvili, Robert Cerny, Lidia Sobkow, and Marianne Bronner-Fraser. Migratory patterns and developmental potential of trunk neural crest cells in the axolotl embryo. *Developmental Dynamics*, 236(2):389–403, 2007.

- [56] Lidia Sobkow, Hans-Henning Epperlein, Stephan Herklotz, Werner L Straube, and Elly M Tanaka. A germline gfp transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Developmental Biology*, 290(2):386–397, 2006.
- [57] Yuka Taniguchi, Thomas Kurth, Daniel Meulemans Medeiros, Akira Tazaki, Robert Ramm, and Hans-Henning Epperlein. Mesodermal origin of median fin mesenchyme and tail muscle in amphibian larvae. *Scientific reports*, 5(1):1–14, 2015.
- [58] Erin Betters, Ying Liu, Anders Kjaeldgaard, Erik Sundström, and Martín I García-Castro. Analysis of early human neural crest development. *Developmental Biology*, 344(2):578–592, 2010.
- [59] Raul E Diaz Jr, Natalia A Shylo, Daniela Roellig, Marianne Bronner, and Paul A Trainor. Filling in the phylogenetic gaps: induction, migration, and differentiation of neural crest cells in a squamate reptile, the veiled chameleon (*Chamaeleo calyptratus*). *Developmental Dynamics*, 248(8):709–727, 2019.
- [60] Michelle Reyes, Katrina Zandberg, Iska Desmawati, and Maria E de Bellard. Emergence and migration of trunk neural crest cells in a snake, the California Kingsnake (*Lampropeltis getula californiae*). *BMC Developmental Biology*, 10(1):1–14, 2010.
- [61] Judith A Cebra-Thomas, Erin Betters, Melinda Yin, Callie Plafkin, Kendra McDow, and Scott F Gilbert. Evidence that a late-emerging population of trunk neural crest cells forms the plastron bones in the turtle *trachemys scripta*. *Evolution & Development*, 9(3):267–277, 2007.
- [62] Martyna Lukoseviciute, Sarah Mayes, and Tatjana Sauka-Spengler. Neuromesodermal progenitor origin of trunk neural crest in vivo. *bioRxiv*, June 2021.
- [63] David W Raible, Andrew Wood, Wendy Hodsdon, Paul D Henion, James A Weston, and Judith S Eisen. Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish. *Developmental Dynamics*, 195(1):29–42, 1992.
- [64] Heather L Stickney, Michael JF Barresi, and Stephen H Devoto. Somite development in zebrafish. *Developmental Dynamics*, 219(3):287–303, 2000.
- [65] Elizabeth M Morin-Kensicki and Judith S Eisen. Sclerotome development and peripheral nervous system segmentation in embryonic zebrafish. *Development*, 124(1):159–167, 1997.
- [66] Yasuko Honjo and Judith S Eisen. Slow muscle regulates the pattern of trunk neural crest migration in zebrafish. *Development*, 132(20):4461–4470, 2005.
- [67] Kathryn W Tosney, Denise B Dehnbostel, and Carol A Erickson. Neural crest cells prefer the myotome’s basal lamina over the sclerotome as a substratum. *Developmental Biology*, 163(2):389–406, 1994.
- [68] Roger C Ma, Craig T Jacobs, Priyanka Sharma, Katrinka M Kocha, and Peng Huang. Stereotypic generation of axial tenocytes from bipartite sclerotome domains in zebrafish. *PLoS genetics*, 14(11):e1007775, 2018.
- [69] Min An, Rushu Luo, and Paul D Henion. Differentiation and maturation of zebrafish dorsal root and sympathetic ganglion neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 446(3):267–275, 2002.

- [70] Robert N Kelsh, Michael Brand, Yun-Jin Jiang, Carl-Philipp Heisenberg, Shuo Lin, Pascal Haffter, Jörg Odenthal, Mary C Mullins, FJ Van Eeden, Makoto Furutani-Seiki, et al. Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development*, 123(1):369–389, 1996.
- [71] Darren T Gilmour, Hans-Martin Maischein, and Christiane Nüsslein-Volhard. Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron*, 34(4):577–588, 2002.
- [72] Moya Smith, Annabelle Hickman, Dee Amanze, Andrew Lumsden, and Peter Throgood. Trunk neural crest origin of caudal fin mesenchyme in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 256(1346):137–145, 1994.
- [73] Raymond Teck Ho Lee, Ela W Knapik, Jean Paul Thiery, and Thomas J Carney. An exclusively mesodermal origin of fin mesenchyme demonstrates that zebrafish trunk neural crest does not generate ectomesenchyme. *Development*, 140(14):2923–2932, 2013.
- [74] Atsuko Shimada, Toru Kawanishi, Takuya Kaneko, Hiroki Yoshihara, Tohru Yano, Keiji Inohaya, Masato Kinoshita, Yasuhiro Kamei, Koji Tamura, and Hiroyuki Takeda. Trunk exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nature Communications*, 4(1):1–8, 2013.
- [75] Mai Togawa, Yuna Endo, Nobuo Suzuki, Hayato Yokoi, and Tohru Suzuki. Identification of sox10-positive cells at the dorsal fin base of juvenile flounder that are correlated with blind-side skin ectopic pigmentation. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 330(8):427–437, 2018.
- [76] Minato Miyake, Michiharu Sekine, Tohru Suzuki, and Hayato Yokoi. Visualization of sox10-positive chromatoblasts by gfp fluorescence in flounder larvae and juveniles using electroporation. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 336(5):393–403, 2021.
- [77] Soma Dash and Paul Trainor. The development, patterning and evolution of neural crest cell differentiation into cartilage and bone. *Bone*, 137:115409, 2020.
- [78] Moya M Smith and Brian K Hall. A developmental model for evolution of the vertebrate exoskeleton and teeth. *Evolutionary biology*, pages 387–448, 1993.
- [79] Harukazu Nakamura and Christiane S Ayer-Le Lievre. Mesectodermal capabilities of the trunk neural crest of birds. *Development*, 70(1):1–18, 1982.
- [80] Imelda M McGonnell and Anthony Graham. Trunk neural crest has skeletogenic potential. *Current Biology*, 12(9):767–771, 2002.
- [81] Juliana M Coelho-Aguiar, Nicole M Le Douarin, and Elisabeth Dupin. Environmental factors unveil dormant developmental capacities in multipotent progenitors of the trunk neural crest. *Developmental Biology*, 384(1):13–25, 2013.
- [82] Tatsuya Hirasawa and Shigeru Kuratani. Evolution of the vertebrate skeleton: morphology, embryology, and development. *Zoological Letters*, 1(1):1–17, 2015.
- [83] Philip CJ Donoghue and Ivan J Sansom. Origin and early evolution of vertebrate skeletonization. *Microscopy research and technique*, 59(5):352–372, 2002.

- [84] Brian K Hall. Endoskeleton/exo (dermal) skeleton—mesoderm/neural crest: two pair of problems and a shifting paradigm. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4):608–615, 2014.
- [85] Jean-Yves Sire and Ann Huysseune. Formation of dermal skeletal and dental tissues in fish: a comparative and evolutionary approach. *Biological Reviews*, 78(2):219–249, 2003.
- [86] Jean-Yves Sire, Philip CJ Donoghue, and Matthews K Vickaryous. Origin and evolution of the integumentary skeleton in non-tetrapod vertebrates. *Journal of Anatomy*, 214(4):409–440, 2009.
- [87] Henry Magloire, Marie-Lise Couble, Annick Romeas, and Françoise Bleicher. Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses. *Cell biology international*, 28(2):93–99, 2004.
- [88] Brian K Hall. *Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology*. Elsevier, 2005.
- [89] Jean-Yves Sire. Scales in young *Polypterus senegalus* are elasmoid: new phylogenetic implications. *American Journal of Anatomy*, 186(3):315–323, 1989.
- [90] Matthew K Vickaryous and Jean-Yves Sire. The integumentary skeleton of tetrapods: origin, evolution, and development. *Journal of Anatomy*, 214(4):441–464, 2009.
- [91] Philip Conrad James Donoghue, Ivan James Sansom, and Jason Philip Downs. Early evolution of vertebrate skeletal tissues and cellular interactions, and the canalization of skeletal development. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 306(3):278–294, 2006.
- [92] J Andrew Gillis, Els C Alsema, and Katharine E Criswell. Trunk neural crest origin of dermal denticles in a cartilaginous fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(50):13200–13205, 2017.
- [93] Alessandro Mongera and Christiane Nüsslein-Volhard. Scales of fish arise from mesoderm. *Current Biology*, 23(9):R338–R339, 2013.
- [94] Raymond Teck Ho Lee, Jean Paul Thiery, and Thomas J Carney. Dermal fin rays and scales derive from mesoderm, not neural crest. *Current Biology*, 23(9):R336–R337, 2013.
- [95] Judith A Cebra-Thomas, Anne Terrell, Kayla Branyan, Sonal Shah, Ritva Rice, Lin Gyi, Melinda Yin, Yusha Hu, Gulnar Mangat, Jacqueline Simonet, et al. Late-emigrating trunk neural crest cells in turtle embryos generate an osteogenic ectomesenchyme in the plastron. *Developmental Dynamics*, 242(11):1223–1235, 2013.
- [96] Scott F Gilbert, Gunes Bender, Erin Betters, Melinda Yin, and Judith A Cebra-Thomas. The contribution of neural crest cells to the nuchal bone and plastron of the turtle shell. *Integrative and Comparative Biology*, 47(3):401–408, 2007.
- [97] Jean-Yves Sire. Ganoine formation in the scales of primitive actinopterygian fishes, lepisosteids and polypterids. *Connective Tissue Research*, 33(1-3):213–222, 1995.
- [98] Salif Diedhiou and Peter Bartsch. Staging of the early development of *Polypterus* (Cladistia: Actinopterygii). *Development of Non-teleost Fishes*, pages 104–169, 2009.

-
- [99] Michael Brand, Michael Granato, and Christiane Nüsslein-Volhard. Keeping and raising zebrafish. *Zebrafish: a practical approach*, pages 7–37, 2002.
- [100] Tatiana A Dettlaff, Anna S Ginsburg, and Olga I Schmalhausen. *Sturgeon fishes: developmental biology and aquaculture*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [101] Wilbur L Long and William W Ballard. Normal embryonic stages of the longnose gar, *Lepisosteus osseus*. *BMC Developmental Biology*, 1(1):1–18, 2001.
- [102] Tereza Matějková. Srovnávací a evoluční analýza neurulace bazálních ryb. Master’s thesis, Charles University in Prague, 2018.
- [103] Sophia Goldberg, Akshaya Venkatesh, Jocelyn Martinez, Catherine Dombroski, Jessica Abesamis, Catherine Campbell, Mialishia Mccalipp, and Maria Elena de Bellard. The development of the trunk neural crest in the turtle *trachemys scripta*. *Developmental Dynamics*, 249(1):125–140, 2020.
- [104] Robert N Kelsh. Sorting out sox10 functions in neural crest development. *Bioessays*, 28(8):788–798, 2006.
- [105] Erine H Budi, Larissa B Patterson, and David M Parichy. Post-embryonic nerve-associated precursors to adult pigment cells: genetic requirements and dynamics of morphogenesis and differentiation. *PLoS genetics*, 7(5):e1002044, 2011.
- [106] Martin Minarik, Jan Stundl, Peter Fabian, David Jandzik, Brian D Metscher, Martin Psenicka, David Gela, Adriana Osorio-Pérez, Lenin Arias-Rodriguez, Ivan Horáček, et al. Pre-oral gut contributes to facial structures in non-teleost fishes. *Nature*, 547(7662):209–212, 2017.
- [107] Claudio Araya, Laura C Ward, Gemma C Girdler, and Miguel Miranda. Coordinating cell and tissue behavior during zebrafish neural tube morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 245(3):197–208, 2016.
- [108] Laura Anne Lowery and Hazel Sive. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mechanisms of Development*, 121(10):1189–1197, 2004.
- [109] David H Nichols. Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 64:105–120, 1981.
- [110] Bahram Sadaghiani and Charles H Thiébaud. Neural crest development in the *xenopus laevis* embryo, studied by interspecific transplantation and scanning electron microscopy. *Developmental Biology*, 124(1):91–110, 1987.
- [111] Martin Cheung and James Briscoe. Neural crest development is regulated by the transcription factor sox9. *Development*, 2003.
- [112] Eric Theveneau and Roberto Mayor. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*, 366(1):34–54, 2012.
- [113] Laura S Gammill, Constanza Gonzalez, Chenghua Gu, and Marianne Bronner-Fraser. Guidance of trunk neural crest migration requires neuropilin 2/semaphorin 3f signaling. *Development*, 133(1):99–106, 2006.

- [114] Igor Adameyko, Francois Lallemand, Jorge B Aquino, Jorge A Pereira, Piotr Topilko, Thomas Müller, Nicolas Fritz, Anna Beljajeva, Makoto Mochii, Isabel Liste, et al. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell*, 139(2):366–379, 2009.
- [115] Robert N Kelsh, Kirsten Dutton, Joanne Medlin, and Judith S Eisen. Expression of zebrafish *fkd6* in neural crest-derived glia. *Mechanisms of Development*, 93(1-2):161–164, 2000.
- [116] Marilyn Juarez, Michelle Reyes, Tiffany Coleman, Lisa Rotenstein, Sothy Sao, Darwin Martinez, Matthew Jones, Rachel Mackelprang, and Maria Elena De Bellard. Characterization of the trunk neural crest in the bamboo shark, *Chiloscyllium punctatum*. *Journal of Comparative Neurology*, 521(14):3303–3320, 2013.
- [117] J Andrew Gillis, Melinda S Modrell, R Glenn Northcutt, Kenneth C Catania, Carl A Luer, and Clare VH Baker. Electrosensory ampullary organs are derived from lateral line placodes in cartilaginous fishes. *Development*, 139(17):3142–3146, 2012.
- [118] Joakim Eriksson and Jan Löfberg. Development of the hypochord and dorsal aorta in the zebrafish embryo (*danio rerio*). *Journal of Morphology*, 244(3):167–176, 2000.