Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie

Anežka Kupková

Organizátor levo-pravé asymetrie těla paprskoploutvých ryb

Left-right organizer of body asymmetries in ray-finned fishes

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

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

V Praze, 25. 4. 2022

……

Anežka Kupková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, Mgr. Vladimíru Soukupovi, Ph.D., za jeho ochotu, užitečné rady a čas, který mi věnoval během psaní této práce. Dále děkuji své rodině za podporu během celé doby studia.

Abstrakt

Levo-pravá asymetrie těla se vyskytuje napříč řadou organizmů, a to od bezobratlých až po obratlovce, pro které je typická především asymetrie vnitřních orgánů. Tyto nesouměrnosti se ustanovují již v raných fázích embryonálního vývoje prostřednictvím dočasných struktur nazývaných jako organizátory levo-pravé asymetrie. U paprskoploutvých ryb je nejlépe prostudovaný organizátor u skupiny Teleostei, tzv. Kupfferův váček. Jedná se o dutou strukturu, která je tvořena monociliárními buňkami. Řasinky těchto buněk rotují a svým pohybem generují levotočivý proud extracelulární tekutiny. Tok tekutiny následně umožňuje indukci Nodal signalizační kaskády, která je zodpovědná za levo-pravou orientaci orgánů, a u obratlovců je považována za evolučně konzervovanou. Hlavními účastníky této dráhy jsou faktory Nodal, Pitx2 a Lefty. U ne-teleostních skupin paprskoploutvých ryb se namísto Kupfferova váčku nachází organizátor nazvaný jako střešní deska gastrocoelu, který je více podobný organizátoru obojživelníků a zřejmě je původní pro paprskoploutvé ryby. Tato bakalářská práce pojednává o vzniku a funkci Kupfferova váčku, dále popisuje Nodal signalizační kaskádu, která je tímto organizátorem iniciována, a rovněž porovnává Kupfferův váček s organizátorem ne-teleostních skupin ryb.

Klíčová slova: organizátor, levo-pravá asymetrie, Kupfferův váček, řasinky, Nodal kaskáda

Abstract

Left-right asymmetry of the body occurs across a number of organisms from invertebrates to vertebrates, and is mostly exhibited by the asymmetry of internal organs. These asymmetries are established at early stages of embryonic development due to the action of temporary structures called organizers of left-right asymmetry. In ray-finned fishes, the most-studied organizer is the so-called Kupffer's vesicle present in the teleosts. It is a hollow structure composed of monociliary cells. The cilia of these cells rotate and generate a leftward flow of extracellular fluid. The flow subsequently triggers the induction of the Nodal signalling cascade, which is responsible for left-right organ orientation and is considered evolutionarily conserved in vertebrates. The main participants in this pathway are the Nodal, Pitx2 and Lefty factors. In contrast to teleosts, the left-right organiser of non-teleost ray-finned fishes resembles the gastrocoel roof plate present in amphibians, which is apparently ancestral for ray-finned fishes. This bachelor thesis evaluates the origin and function of Kupffer's vesicle, describes the Nodal signalling cascade triggered by this organizer, and compares Kupffer's vesicle with the organizer of non-teleost ray-finned fishes.

Keywords: organizer, left-right asymmetry, Kupffer's vesicle, cilia, Nodal cascade

Obsah

1 Úvod 1

2 Kupfferův váček jako organizátor levo-pravé asymetrie 2

2.1 Vznik Kupfferova váčku 3

2.2 Struktura Kupfferova váčku 5

2.3 Faktory důležité pro formování Kupfferova váčku a ciliogenezi 6

2.4 Zánik Kupfferova váčku 8

3 Řasinky 9

3.1 Struktura řasinek 9

3.2 Ciliární rotace a levotočivý proud 10

3.3 Vnímání levotočivého proudu řasinkami 11

4 Nodal signalizační kaskáda 13

4.1 Nodal a jeho interakce 13

4.2 Lefty 16

4.3 Pitx2 17

4.4 Charon 18

4.5 Ustanovení asymetrické exprese Nodal signalizační dráhy 19

5 Organizátor levo-pravé asymetrie u ne-teleostních skupin paprskoploutvých ryb 21

6 Závěr 23

7 Seznam zkratek 24

8 Použitá literatura 26

1 Úvod

Obratlovci patří mezi bilaterálně symetrické organismy, avšak jejich vnitřní orgány podléhají značnému asymetrickému rozložení. Mezi levo-pravé asymetrické orgány můžeme zařadit například srdce, játra, slezinu, plíce nebo střeva. Dokonce i v mozku dochází k levo-pravé asymetrii ať už ve funkci mozkových hemisfér nebo ve vývoji habenul (Concha and Wilson, 2001).

Během embryonálního vývoje dochází většinou k normálnímu postavení vnitřních orgánů nazývanému jako *situs solitus*, vzácně pak k zrcadlově obrácenému postavení *situs inversus*. Dále může docházet k *heterotaxii*, kde vzniká převrácené postavení všech nebo některých orgánů vůči levo-pravé ose těla.

Za vznik těchto levo-pravých asymetrií jsou zodpovědné dočasné embryonální struktury označované jako organizátory asymetrie. U savců se jedná o uzel (Bellomo et al., 1996), u ptáků o Hensenův uzel (Cooke, 1995), u obojživelníků o střešní desku gastrocoelu (gastrocoel roof plate) (Schweickert et al., 2007) a u ryb o Kupfferův váček (Essner et al., 2005; Kupffer, 1868). Na těchto strukturách se nacházejí řasinky, které svou rotací dávají vznik levotočivému proudu a následnému spuštění Nodal signalizační kaskády, která je zodpovědná za regulaci levo-pravě asymetrického vývoje (Essner et al., 2002; Nonaka et al., 2002).

V této práci se zaměřuji na vývoj a stavbu Kupfferova váčku a následně jeho funkci pro levo-pravou asymetrii těla ryb skupiny Teleostei v kontextu organizátorů asymetrie obratlovců. Hlavními modelovými druhy pro tento organizátor jsou danio pruhované (*Danio rerio*) a medaka japonská (*Oryzias latipes*). Nicméně u ne-teleostních skupin paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) se organizátor asymetrie podobá spíše střešní desce gastrocoelu obojživelníků. Jediným ne-teleostním druhem, u kterého byl tento organizátor pozorován je jeseter bílý (*Acipenser transmontanus*) ze skupiny chrupavčitých ryb (Chondrostei) (Bolker, 1993).

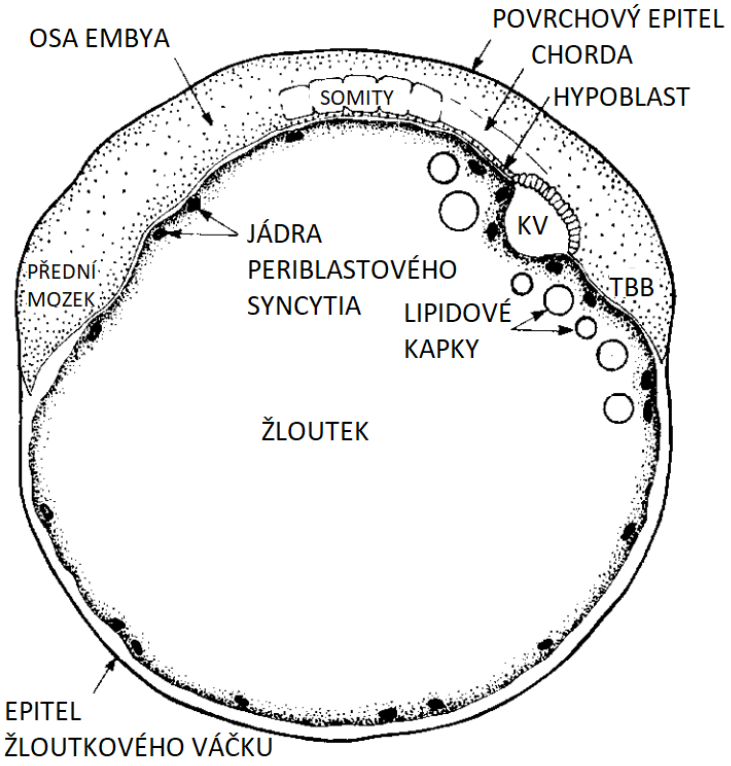
Cílem literární rešerše je shrnout dosavadní poznatky o organizátoru levo-pravé asymetrie u paprskoploutvých ryb a důsledcích jeho vzniku se zaměřením na Kupfferův váček. Zároveň se práce věnuje Nodal signalizační kaskádě, jakožto dráze aktivované díky přítomnosti organizátoru levo-pravé asymetrie a jejíž geny jsou nezbytné pro *situs solitus*. Na závěr je zde popsán organizátor u ne-teleostních skupin paprskoploutvých ryb v porovnání s Kupfferových váčkem u Teleostei.

2 Kupfferův váček jako organizátor levo-pravé asymetrie

Kupfferův váček (KV, Kupffer´s vesicle) je přechodná dutá struktura v posteriorně-ventrální oblasti těla u časných embryí Teleostei. Kupffer jej považoval za rudimentární alantois (Kupffer, 1868). Jedná se o obdobu více studovaného uzlu u myši (Bellomo et al., 1996; Sulik et al., 1994).

Pozorování na fundulu mumiovém (*Fundulus heteroclitus*) ukázala, že z dorzální strany je jeho okraj tvořen sloupcovitými buňkami opatřenými řasinkami a z druhé strany je zakončen prohlubní ve žloutku (viz Obrázek 1). Podle Brummetta a Dumonta (1978) u embryí s větším množstvím žloutku se KV vytváří ještě před ukončením epibolie, na rozdíl od embryí s malým množství žloutku, kde může vzniknout až po jejím ukončení (Brummett and Dumont, 1978).

Díky přítomnosti řasinek je tento organizátor schopný generovat levotočivý tok, nezbytný pro spuštění Nodal signalizační kaskády, která determinuje levo-pravou asymetrii těla (Essner et al., 2005; Nonaka et al., 2002).

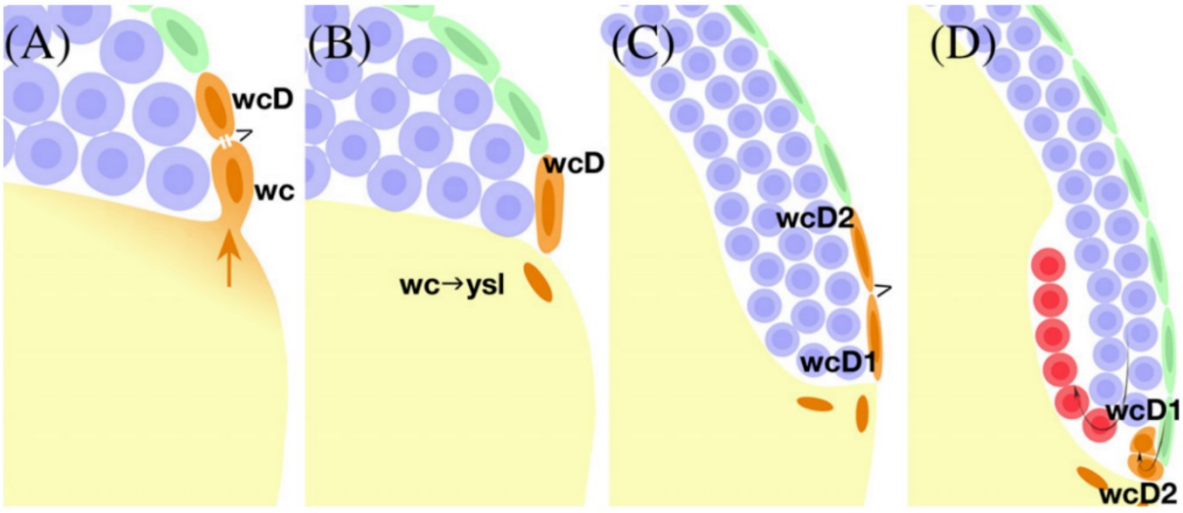


Obrázek 1 Kresba embrya *Fundulus heteroclitus* na základě sagitálních řezů. Kupfferův váček (KV) se nachází v posteriorně-ventrální oblasti těsně před blastémem ocasu (TBB) (převzato a upraveno podle Brummett and Dumont, 1978).

2.1 Vznik Kupfferova váčku

Během stádia střední blastuly dochází u teleostních embryí k oddělení buněčných linií na syncytiální vrstvu žloutku (yolk syncytial layer), obalovou vrstvu (enveloping layer) a vnitřní buňky (deep cells) (Trinkaus, 1984). V průběhu gastrulace všechny tyto linie podstupují epibolii. Vnitřní buňky migrují za účelem vytvoření hypoblastu (Ballard, 1976). V oblasti marginální zóny jsou součástí vnitřních buněk neinvolující endocytické buňky (non-involuting endocytic cells), které svou akumulací vytvářejí tzv. zárodečný prstenec. Zároveň se podílejí na vzniku embryonálního štítu (Cooper and D'Amico, 1996; Melby et al., 1996). Tento útvar vzniká na dorzálním okraji blastodermu a má homologní funkci se Spemannovým organizátorem u obojživelníků, který je nezbytný pro gastrulaci a formování dorzo-ventrální osy (Kimmel et al., 1990; Oppenheimer, 1936; Spemann and Mangold, 1924)

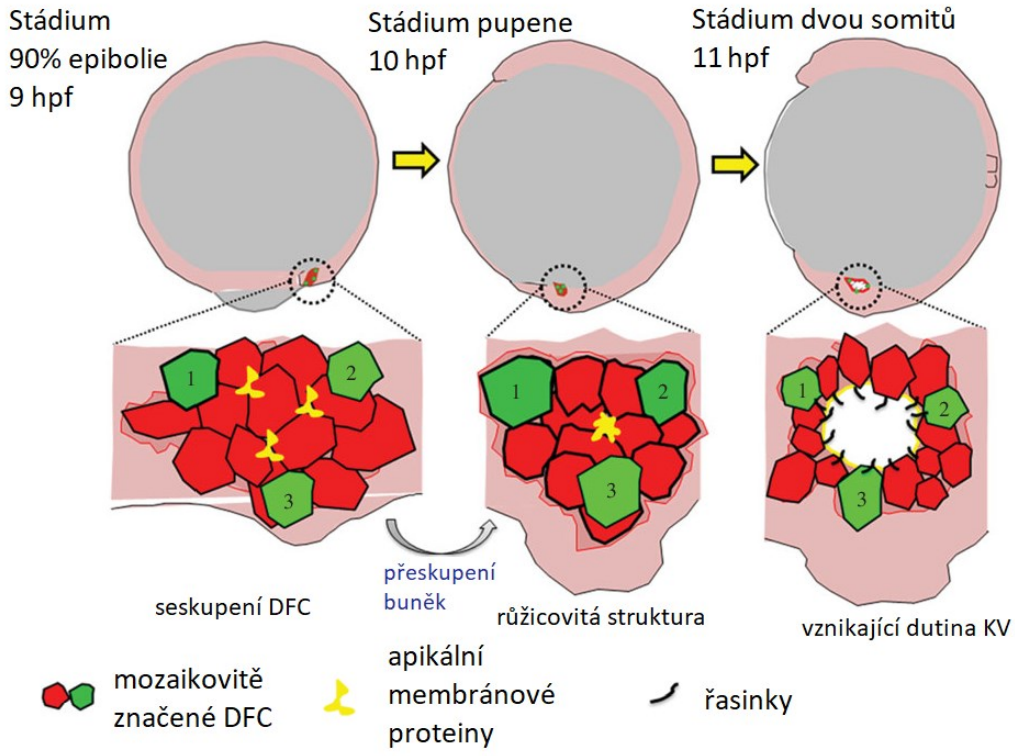
Původně se předpokládalo, že vnitřní neinvolující endocytické buňky se přeskupují, vytvářejí dorzální okraj blastodermu a že právě ony dávají vzniknout tzv. „dorsal forerunner cells" (DFC). Toto seskupení přibližně dvaceti buněk se postupně reorganizuje až vytvoří dutou strukturu nazývanou jako Kupfferův váček (Cooper and D'Amico, 1996). Nicméně novější poznatky u dania pruhovaného (*Danio rerio*) naznačují, že původ DFC tkví v buňkách dorzálního povrchového epitelu (Oteíza et al., 2008).



Obrázek 2 Model vzniku DFC. A) Oranžově jsou znázorněny Wilsonovy buňky (wc), které jsou cytoplazmaticky spojené se žloutkem a obdrží signál nezbytný k indukci DFC. Dále wc předají signál svým dceřiným buňkám (wcD). Zeleně jsou znázorněny buňky obalové vrstvy a modře vnitřní buňky. B) ve stádiu tisíce buněk se wc stávají součástí syncytiální vrstvy žloutky a součástí blastodermu zůstávají pouze wcD. C) V „dome" stádiu se wcD jednou až dvakrát rozdělí. D) Vnitřní buňky podstupují ingresi a později vytvářejí mezendoderm (červeně), zároveň ingresují i wcD1 a wcD2 a vytvářejí DFC, které dávají vznik KV (převzato a upraveno podle Warga and Kane, 2018).

Pro vznik DFC je nezbytný signál ze žloutku (viz obrázek 2A). Nejdéle cytoplazmaticky propojené buňky obalové vrstvy se žloutkem nazvali Warga a Kane (2018) jako tzv. Wilsonovy buňky. Tyto buňky se nacházejí v marginální oblasti obalové vrstvy. Předávají signál svým dceřiným buňkám, které se jednou až dvakrát dělí. Jedna dceřiná buňka putuje do žloutku a druhá dává vznik DFC (viz obrázek 2B) (Warga and Kane, 2018). Buňky podstupují ingresi, čímž se dostávají pod obalovou vrstvu (viz obrázek 2C). DFC exprimují E-cadherin a N-cadherin, které umožňují propojovat buňky pomocí adherens junctions. Následně pro vzájemnou soudržnost využívají apikální membránové proteiny a tight junctions (Babb and Marrs, 2004; Melby et al., 1996; Oteíza et al., 2008; Warga and Kane, 2007).

K ingresi DFC může docházet ve dvou obdobích, a to na začátku a uprostřed gastrulace. Aby udržely kontakt s ostatními buňkami, DFC při pronikání vystavují své filopodie. Po proběhlé ingresi buňky zaujmou kulovitý tvar a spojí se s již dříve ingresovanými buňkami (viz obrázek 2D) (Warga and Kane, 2018). V konečném stádiu epibolie se DFC oddělují od obalové vrstvy a vytvářejí trojrozměrné růžicovité struktury (viz Obrázek 3, 9 hpf). Následně dochází k přeskupení růžic a vzniku jedné velké růžice s dutinou (viz Obrázek 3, 10-11 hpf). Při vytvoření dutiny současně probíhá ciliogeneze, kdy se začínají objevovat první řasinky (Oteíza et al., 2008).



Obrázek 3 Schéma transformace dorsal forerunner cells (DFC) do Kupfferova váčku (KV) u dania pruhovaného (*Danio rerio*). Shluk DFC v 90% epibolii (9 hodin po fertilizaci) se přeskupuje v růžicovitou strukturu ve stádiu pupene (10 hodin po fertilizaci). Uprostřed se nachází bod apikálních membránových proteinů. Ve stádium dvou somitů (11 hodin po fertilizaci) se vytvářejí řasinky a vzniká dutina naplněná tekutinou (převzato a upraveno podle Dasgupta and Amack, 2016).

2.2 Struktura Kupfferova váčku

Ačkoliv se KV u různých druhů může mírně lišit, nachází se na ventrální a posteriorní straně těla před pupenem ocasu. Jedny z prvních poznatků byly zjištěny na fundulu mumiovém (*Fundulus heteroclitus*), kde je Kupfferův váček tvořen mimořádně velkými sloupcovitými buňkami. Ve středu každé sloupcovité buňky se nachází dlouhá řasinka (cilie) mířící směrem do dutiny váčku (Brummett and Dumont, 1978). U medaky japonské (*Oryzias latipes*) byly řasinky stejně jako u myšího organizátoru pozorovány pouze na dorzální straně (Okada et al., 2005), kdežto u dania pruhovaného (*Danio rerio*) na ventrální i dorzální straně KV (Kreiling et al., 2007). Zároveň jsou řasinky v organizátoru nerovnoměrně rozmístěny. Nejvíce se jich vyskytuje na dorzálním a anteriorním povrchu. Na dorzální straně je oproti ventrální čtyřikrát více řasinek. Právě toto nepravidelné rozmístění může být příčinou směru levotočivého toku tekutiny uprostřed Kupfferova váčku (Kreiling et al., 2007).

Pro anterio-posteriorní rozložení ciliárních buněk je důležitá Rho kináza Rock2b, která je zároveň nezbytná pro vytvoření KV z DFC. Při jejím úbytku dochází k narušení tohoto uspořádání řasinek a levotočivého toku (Wang et al., 2011). Rho kináza je GTPáza, která je aktivována pomocí Wnt/PCP signální dráhy prostřednictvím proteinu Dishevelled (Park et al., 2008). Rock2b tvoří společně s non-muscle Myosinem II tzv. Rock2b-myosionou kaskádu, která je aktivní mezi dvou až osmi somitovým stádiem. Při tomto procesu dochází k formování dutiny KV a následně anterio-posteriorně asymetrickému rozložení řasinek (Wang et al., 2012).

Vzhledem k tomu, že z každé buňky Kupfferova váčku vystupuje jedna řasinka, jeho velikost koreluje s celkovým počtem řasinek. Studie u dania pruhovaného ukázaly, že velikost KV může být poměrně variabilní. Rozměry jeho vnitřního povrchu u stádií pupene až osmi somitů byly pozorovány v rozmezí od 1 300 μm^2 do 1 700 μm^2. Velikost KV mimo stanovené rozmezí narušuje jeho funkci v ustanovení levo-pravé asymetrie (Gokey et al., 2016). Předpokládá se, že za tuto proměnlivost je zodpovědný protein Rab11a, který reguluje transport váčků v buňce (Westlake et al., 2011). Na rozdíl od počtu řasinek a celkové velikosti KV byla délka řasinek méně různorodá a nezávislá na velikosti dutiny (Gokey et al., 2016).

2.3 Faktory důležité pro formování Kupfferova váčku a ciliogenezi

Ačkoliv procesy formování dutiny a ciliogeneze nastávají současně, přepokládá se, že probíhají nezávisle na sobě. Pro utváření a velikost dutiny Kupfferova váčku je nezbytný protein Cftr (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Bagnat et al., 2013). Tento protein je u obratlovců důležitý pro transport chloridů a regulaci sekrece tekutiny (Anderson et al., 1991). U mutantů Cftr se objevují defekty dutiny a funkce KV, avšak řasinky samy o sobě zůstávají nezasažené (Bagnat et al., 2013).

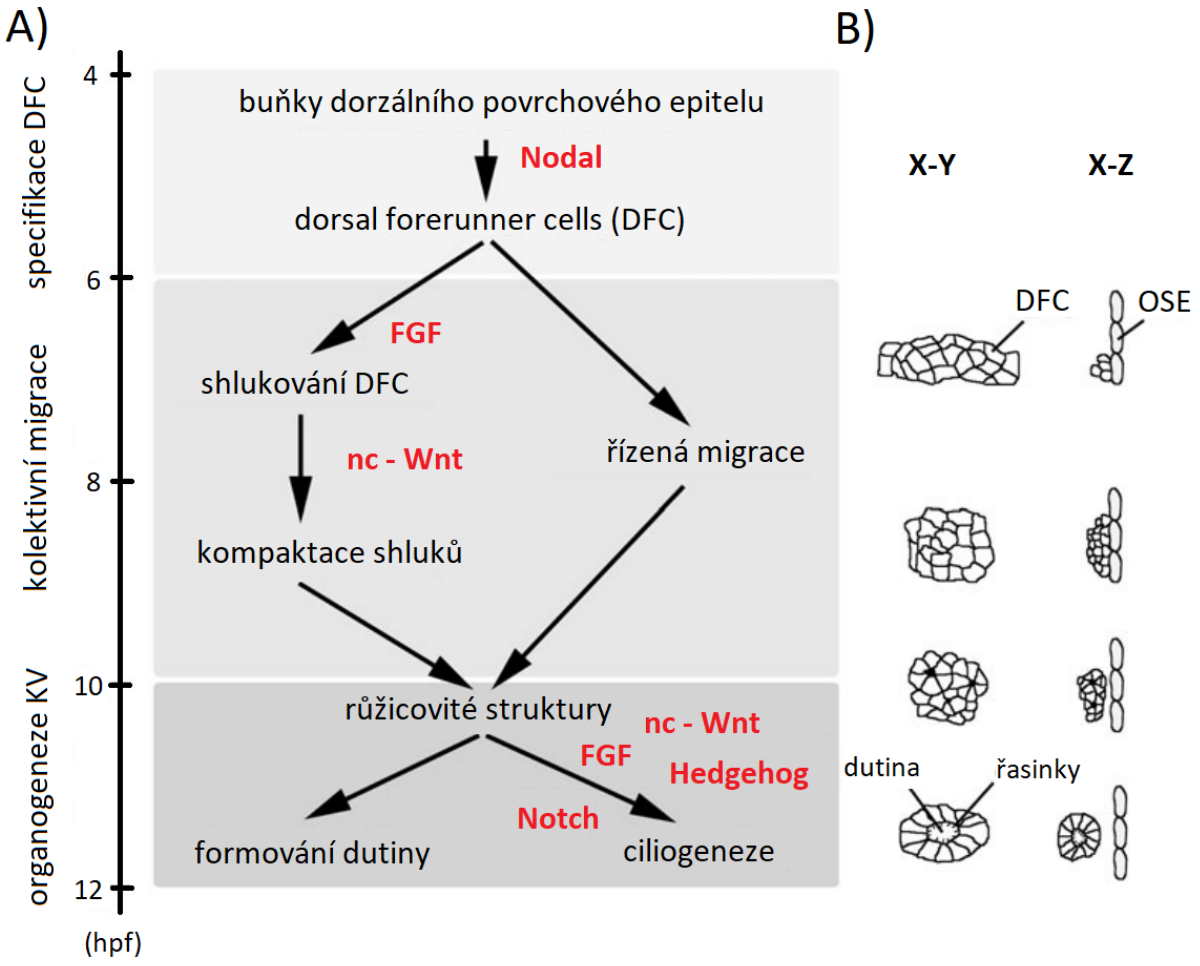
Pro vznik KV má důležitou roli H^+V-ATPáza, jejíž blokace způsobuje u embryí dania *heterotaxii* (Adams et al., 2006). Zároveň byla pozorována funkce jejího doplňkového proteinu Atp6ap1b, který bývá označován také jako Ac45. Během epibolie DFC exprimují *Atp6ap1b* a podílí se tak na regulaci H^+V-ATPázy. Atp6ap1b je nezbytný pro proliferaci DFC, a tudíž ovlivňuje i velikost Kupfferova váčku, zároveň je nezbytný pro ciliogenezi. Mutanti v tomto genu mají nižší počet ciliárních buněk tvořících KV (Gokey et al., 2015; Supek et al., 1994). Na ingresi buněk dorzálního povrchového epitelu se také podílí gen Nodal signalizační dráhy *cyclops* (Oteíza et al., 2008).

Pro tvorbu dutiny a ciliogenezi je dále důležitý protein Lgl2 (lethal giant larvae 2), který ovlivňuje buněčnou polaritu. Lgl2 se podílí na mezibuněčném kontaktu prostřednictvím E-cadherinu a zároveň interaguje s výše zmíněným Rab11a. Při porušení genu *Lgl2* dochází k vytvoření menší dutiny KV a snížení počtu a délky řasinek (Tay et al., 2013).

Na ciliogenezi se také podílejí transkripční faktory Foxj1a a Foxj1b. Exprimují se v průběhu gastrulace v DFC a účastní se regulace Hedgehog signalizační dráhy. Při knockdownu *Foxj1a* a *Foxj1b* buňky postrádají řasinky nebo jsou jejich řasinky příliš krátké. (Stubbs et al., 2008; Yu et al., 2008). Foxj1a je přímo regulován pomocí Wnt/β-catenin signální dráhy, která zároveň interaguje s další signalizací zúčastněné v ciliogenezi, a to FGF (fibroblast growth factor) (viz obrázek 4) (Caron et al., 2012). FGF faktory jsou nezbytné pro správnou délku řasinek. Abnormálně krátké řasinky byly nalezeny při knockdownu *Fgf8*, *Fgf24* nebo *Fgf4* (Neugebauer et al., 2009; Yamauchi et al., 2009).

Délka řasinek je zároveň regulována nekanonickou Notch signální dráhou. Její součástí je DeltaD ligand, který při své snížené aktivitě způsobuje zkrácení řasinek. Ty pak nejsou schopny vytvořit plnohodnotný tok. Naopak při zvýšené aktivitě Notch signální dráhy dochází ke vzniku delších řasinek. Jak příliš dlouhé řasinky ovlivňují tok, nebylo blíže zkoumáno (Lopes et al., 2010).

Dalšími potřebnými faktory pro vytvoření Kupfferova váčku jsou T-box transkripční faktory Ntl (No tail) a Tbx16 (Amack et al., 2007). Ntl je homologní k savčímu Brachyury a je nezbytný pro tvorbu notochordu a ocasní části. Nezávisle na této funkci je důležitý pro transformaci DFC do duté struktury (Amack and Yost, 2004). Tbx16 je potřebný pro shlukování DFC. Jeho funkce je narušena při mutaci genu *spadetail* (Amack et al., 2007). Tyto T-box transkripční faktory se zároveň podílejí na regulaci exprese genů *polaris* a *pkd2* (*polycystin-2*), které se exprimují v DFC a také se účastní na správném formování KV a pohyblivosti řasinek (Bisgrove et al., 2005)



Obrázek 4 A) Vznik KV z dorsal forerunner cells (DFC). Vytvoření KV je zde popsáno ve třech krocích – nejprve dochází ke vzniku DFC z buněk dorzálního povrchového epitelu, následně se DFC shlukují a kolektivně migrují směrem k vegetálnímu pólu a ve třetím kroku dochází ke vzniku růžicovitých struktur a následnému formování dutiny a ciliogenezi. Na vzniku KV se podílí Nodal, FGF, Notch, Hedgehog a nekanonická Wnt (nc – Wnt) dráha. B) Schéma formování váčku z pohledu osy XY a XZ. OSE = krycí povrchový ektoderm (overlapping surface ectoderm) (převzato a upraveno podle Matsui and Bessho, 2012).

2.4 Zánik Kupfferova váčku

Kupfferův váček jakožto embryonální struktura, je pouze dočasná (Brummett and Dumont, 1978). U dania pruhovaného začíná tento orgán asymetrie zanikat kolem stádia čtrnácti až šestnácti somitů, avšak po zániku Kupfferova váčku jen malé množství buněk, které ho tvořily podstupuje apoptózu (Ikeda et al., 2022).

Ve stádiu čtrnácti somitů se buňky KV oddělují od syncytiální vrstvy žloutku, dochází ke zmenšení dutiny a buňky začínají migrovat. Po kolapsu KV dávají jeho buňky vzniku tzv. KVDCs (KV derived cells). Většina KVDCs podstupuje epitelo-mesenchymální tranzici (Ikeda et al., 2022). Jedná se o dynamický proces, ve kterém buňky ztrácejí apikálně-bazální polaritu, ztrácejí mezibuněčné spojení jako je tight junctions a dochází k cytoskeletárním přestavbám. Této tranzice se účastní dráhy jako je Wnt, TGFβ, FGF a Notch (Amack, 2021; Row et al., 2016). Je zajímavé, že KV během vývoje podstupuje několik těchto tranzicí. Nejprve probíhá epitelo-mesenchymální tranzice při vzniku DFC, následně mesenchym-epiteliální při vzniku KV z DFC a nakonec ještě jednou epitelo-mesenchymální tranzice při zániku Kupfferova váčku a migraci jeho buněk (Amack, 2021; Amack et al., 2007; Oteíza et al., 2008).

Již v devadesátých letech byl pozorován osud DFC v chordě, ocasním mesenchymu a svalech ocasu (Melby et al., 1996). U embryí dvaceti dvou somitů byly tyto buňky nalezeny kolem již zaniklé dutiny a zároveň se některé z nich objevovaly v notochordu a presomitickém mezodermu. Většina řasinek, která se nachází v dutině Kupfferova váčku, však po jeho kolapsu zaniká (Ikeda et al., 2022).

U dania byla přítomnost KVDCs pozorována ve všech buněčných populacích somitů – myotomu, sklerotomu i dermatomu. Ve stádiu dvaceti šesti somitů se některé z těchto buněk přemisťují směrem k posterioru a dávají vznik chordě a hypochordu. Zajímavé je, že co se týče mezodermu laterální destičky, tak zde výskyt KVDCs byl vyvrácen (Ikeda et al., 2022).

3 Řasinky

Řasinky neboli cilie jsou tubulinové struktury plnící v organismech mnoho rolí ať už v dýchacím epitelu, trávicí soustavě, pohlavní soustavě nebo právě v organizátorech asymetrie, kde umožňují vznik levotočivého proudu (Nonaka et al., 2002). Jejich nepohyblivost nebo špatná funkce mohou vést k onemocněním jako je Kartagenerův syndrom. U jedinců s tímto onemocněním dochází k problémům v dýchacích cestách, neplodnosti a zároveň k *situs inversus* (Afzelius, 1976).

3.1 Struktura řasinek

Základní jednotkou každé řasinky je axonema, která se skládá ze svazků mikrotubulů a vystupuje z bazálního tělíska. Tyto organely bývají běžně rozdělovány podle konformace mikrotubulů na 9 + 2 (9 mikrotubulových doubletů a centrální pár mikrotubulů) a 9 + 0 (pouze 9 mikrotubulových doubletů). Seskupení 9 + 0 navíc často postrádá molekulární motory a bývá označováno jako primární cilie. Díky tomu tyto řasinky bývají nepohyblivé a obvykle mívají senzorickou funkci. Dále se u axonemy mohou vyskytovat vnější a vnitřní dyneinová ramena a radiální paprsky (Satir and Christensen, 2007). Zajímavostí je, že existuje ještě mikrotubulová konformace 9 + 4, která byla nalezena u králíka (Feistel and Blum, 2006).

U myšího organizátoru byly nalezeny primární cilie s 9 + 0 konformací. Proto se nejprve usuzovalo, že se jedná o nepohyblivé řasinky. Nicméně molekulární motory, běžně typické pro konformaci 9 + 2, se zde také vyskytují. Jedná se o členy kinezinové rodiny KIF3A a KIF3B a asociované proteiny KAP3 (Bellomo et al., 1996; Nonaka et al., 1998). Nacházejí se zde vnější dyneiny lrd (left-right dynein) a Dnahc5 (dynein axonemal heavy chain 5), které umožňují rotaci pohyblivých řasinek. Při mutaci *lrd* nebo *Dnahc5* dochází u jedinců k *situs inversus* (Olbrich et al., 2002; Supp et al., 1997). Předpokládá se, že kromě pohyblivých se zde vyskytují i nepohyblivé řasinky. U nich se nevyskytují lrd dyneiny, mají senzitivní funkci a jsou umístěny v periferii uzlu (McGrath et al., 2003).

V Kupfferově váčku medaky japonské bylo nalezeno seskupení mikrotubulů 9 + 0, stejně jako u myši (Okada et al., 2005). Kdežto u dania pruhovaného byla pozorována 9 + 2 konformace s přítomností vnějších dyneinových ramen. Délka řasinek se pohybuje okolo 3 µm (Kramer-Zucker et al., 2005).

V organizátoru Teleostei byly nalezeny pouze pohyblivé řasinky (Kamura et al., 2011; Okabe et al., 2008). Podobně jako u myši se zde vyskytuje homolog lrd dyneinu − lrdr1. Při

jeho knockdownu embrya postrádají pohyblivé řasinky a nedochází k tvorbě levotočivého proudu (Essner et al., 2002, 2005).

3.2 Ciliární rotace a levotočivý proud

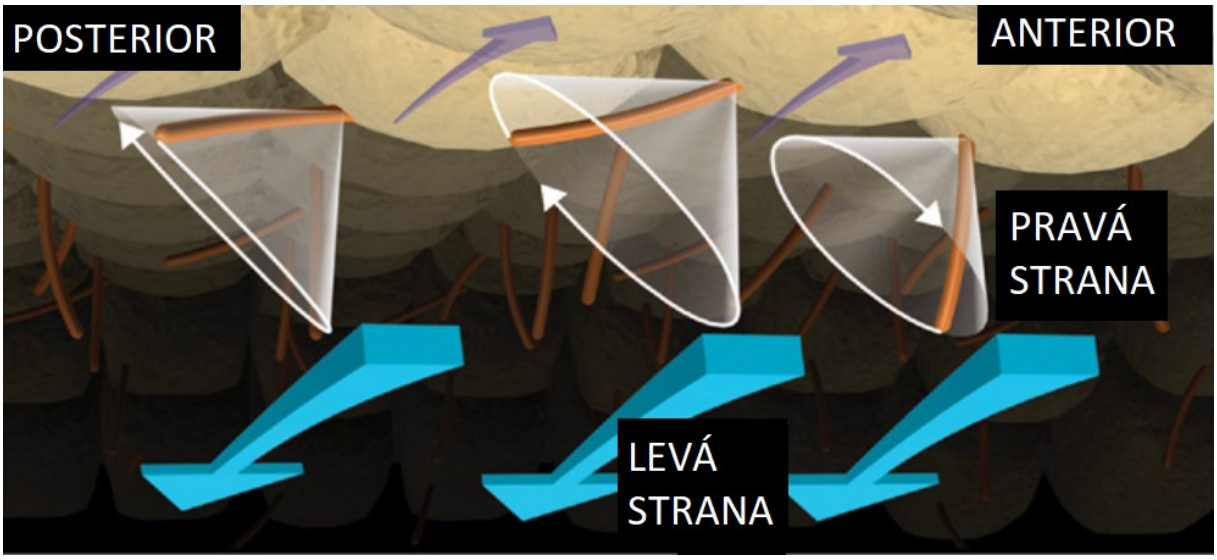
Pozorování u dania potvrdila, že řasinky Kupfferova váčku jsou pohyblivé a pravidelně rotují po své trajektorii. Při ztrátě tohoto pohybu dochází u embryí k laterálním defektům (Kramer-Zucker et al., 2005; Okabe et al., 2008). U myšího uzlu se řasinky nacházejí v rovině, a rotují všechny synchronně stejným směrem (Nonaka et al., 1998). Taktéž v Kupfferově váčku dania pruhovaného se řasinky pohybují synchronně, ale vzhledem k tomu, že se nacházejí v duté trojrozměrné struktuře, řasinky na ventrální a dorzální straně rotují proti sobě (Okabe et al., 2008).

Řasinky jsou nakloněny směrem k posterioru pod úhlem přibližně 40˚, přičemž toto postavení ovlivňuje trajektorii jejich otáčení. S ohledem na posteriorní náklon při své rotaci opisují tvar elipsy (viz Obrázek 5) (Okada et al., 2005). Řasinky však nevyrůstají přímo s náklonem, dochází k tomu postupně posteriorním posunem bazálního tělíska za nezbytné účasti nekanonické Wnt/PCP signální dráhy. Pro správné naklonění řasinek v KV je nezbytný gen této dráhy, a to *Vangl2* (*Van Gogh like 2*). Jeho narušením dochází k abnormalitám levotočivého proudu a pozdějšího vývoje (Borovina et al., 2010).

Díky kmitání řasinek dochází k tvorbě toku extracelulární tekutiny. Při absenci toku nastává náhodné určení levé a pravé strany těla (Nonaka et al., 1998). Jeho vznik je považován za hlavní bod zlomu levo-pravé symetrie, který je evolučně konzervovaný u obratlovců (Tabin, 2005). Zajímavé je, že rotující řasinky a tok nebyly nalezeny v Hensenově uzlu kuřete a uzlu prasete, ačkoliv se zde vyskytují asymetricky exprimované geny (Männer, 2001). Blum et al. předložili hypotézu, že zde dochází v průběhu časné gastrulace k levotočivému přetočení organizátoru na bok. Díky této rotaci následně nastává asymetrická exprese genů bez nutnosti extracelulárního proudu (Blum et al., 2014).

U dania pruhovaného dochází v KV ke třem hlavním proudům tekutiny. Při dorzálním pohledu se dorzální řasinky pohybují proti směru hodinových ručiček, ventrální po směru hodinových ručiček a řasinky mezi nimi v obou směrech. Dominantní tok byl však pozorován levotočivý (Okabe et al., 2008). Tento směr je zřejmě udržován vyšším zastoupením řasinek na dorzální straně oproti ventrální, jak již bylo zmíněno výše (Kreiling et al., 2007). U medaky japonské se řasinky vyskytují pouze na dorzálním povrchu KV a taktéž indukují levotočivý proud (Okada et al., 2005).

V myším uzlu se vyskytuje přibližně 200–300 řasinek (Shiratori and Hamada, 2006). Z nynějších poznatků vyplývá, že již pouhé dvě pohyblivé řasinky jsou schopné indukovat slabý levotočivý proud (Shinohara et al., 2012). Studie u dania ukázaly, že v KV dochází k normální lateralizaci orgánů při výskytu 30 a více řasinek (Sampaio et al., 2014).



Obrázek 5 Model pohybu řasinek a tvorby levotočivého toku (převzato a upraveno podle Hirokawa et al., 2006).

3.3 Vnímání levotočivého proudu řasinkami

Při vzniku extracelulárního toku dochází k asymetrické expresi genu *nodal*, hlavního genu pro levo-pravou asymetrii (Collignon et al., 1996; Nonaka et al., 2002). Existuje několik modelů pro vnímání levotočivého proudu, těmi stěžejními jsou chemosenzitivní a mechanosenzitivní (Hirokawa et al., 2006; McGrath et al., 2003; Nonaka et al., 1998).

Mechanosenzitivní model se také označuje jako model dvou cilií. Je založený na existenci dvou typů řasinek, pohyblivých a nepohyblivých, jak bylo pozorováno u myši. Pohyblivé řasinky zajišťují pohyb extracelulární tekutiny a nepohyblivé senzorické vnímání toku a asymetrickou expresi genu *nodal* (McGrath et al., 2003). Tento model se však zdá být pro Teleostei neodpovídající, jelikož u této skupiny nebyly nalezeny nepohyblivé řasinky. Zdá se, že u této skupiny mají pohyblivé řasinky zároveň i senzorickou funkci (Kamura et al., 2011).

Chemosenzitivní model předpokládá vnímání toku na základě hladiny morfogenu. Buňky organizátoru uvolňují morfogen a díky toku je morfogen směřován na levou stranu organizátoru. Na této straně organizátoru se poté ustanoví gradient, který umožňuje spuštění

kaskády genů determinujících levo-pravou asymetrii těla (Nonaka et al., 1998; Okada et al., 2005).

Pro oba tyto modely je nezbytný asymetrický gradient vápenatých iontů. Studie na myším organizátoru ukázaly, že hladina těchto iontů je udržována na základě Polycystin-2 iontových kanálů (McGrath et al., 2003; Pennekamp et al., 2002). Jedná se o transmembránové proteiny procházející šestkrát membránou, které jsou mimo jiné spojovány s onemocněním polycystických ledvin (González-Perrett et al., 2001; Mochizuki et al., 1996). Pro správné složení Polycystinu-2 na plazmatické membráně je nutná interakce s Polycystinem-1 přec C terminální doménu (Qian et al., 1997). Mutanti těchto proteinů vykazují laterální abnormality (McGrath et al., 2003; Pennekamp et al., 2002)

Homologní kanály byly nalezeny i u dania (Bisgrove et al., 2005) a medaky (Kamura et al., 2011). Polycystin-2 interakcí s Polycystinem-1 umožňuje regulaci vyššího zastoupení vápenatých iontů na levé straně organizátoru, což je nezbytné pro správnou expresi genu *nodal* (Pennekamp et al., 2002; Hanaoka et al., 2000). Pozorování u medaky potvrdila výskyt Polycytinu-1 a 2 na všech řasinkách Kupfferova váčku a zároveň jejich význam pro vnímání extracelulárního toku (Kamura et al., 2011).

Existuje ještě jeden model, který dále rozšiřuje chemosenzitivní model. Předpokládá, že zvýšení vápenatých iontů na levé straně organizátoru se uskutečňuje pomocí tzv. nodal vezikulárních částic (nodal vesicular parcels), které byly nalezeny u savčího organizátoru. Tyto částice jsou aktivovány na základě interakce s FGF a zároveň jsou asociovány s levostranným transportem Sonic Hedgehog a kyseliny retinové (Tanaka et al., 2005). Nicméně nodal vezikulární částice byly popsány hlavně na savčím uzlu a u ryb nebyly dostatečně prozkoumány. Nabízí se mnoho variant, jakým způsobem by řasinky mohly vnímat tok na základě iontových kanálů. Žádná z nich však nebyla dostatečně experimentálně prokázána a mechanizmus je doposud neznámý (Ferreira et al., 2019).

U dania byla nalezena účast na asymetrickém toku vápenatých iontů u inositol polyfosfatázy. Při jejím knockdownu dochází k randomizaci pozice vnitřních orgánů (Sarmah et al., 2005). Dále se na levé straně Kupfferova váčku nachází aktivní protein kináza CAMK-II, která je závislá na aktivitě polycysteinu-2 a ryanodinového receptoru RyR3. CAMK-II se aktivuje autofosforylací přibližně ve stádiu deseti až dvanácti somitů. Mutanti v CAMK-II vykazují laterální defekty (Francescatto et al., 2010).

4 Nodal signalizační kaskáda

Nodal kaskáda je považována za evolučně konzervovanou dráhu levo-pravé asymetrie u všech obratlovců (Blum et al., 2014). Její exprese je umožněna díky organizátoru, který indukoval extracelulární tok. Princip této signální dráhy je založen na asymetrické expresi třech hlavních genů[1] – *nodal*, *pitx2* a *lefty* (Nakamura and Hamada, 2012; Nakamura et al., 2006). Každá skupina obratlovců má různý počet homologů genu *nodal*. U Teleostei byly nalezeny tři *nodal* geny, a to *squint*/*Ndr1*, *cyclops*/*Ndr2* a *southpaw*/*Ndr3* (Feldman et al., 1998; Rebagliati et al., 1998; Soroldoni et al., 2007; Long et al. 2003).

4.1 Nodal a jeho interakce

Nodal patří do rodiny růstových faktorů TGFβ (transforming growth factor β), které jsou součástí cytokinů. Je nezbytný pro formování mezodermu, entodermu a vznik levo-pravé asymetrie těla (Conlon et al., 1994; Zhou et al., 1993).

Nodal proteiny vznikají nejprve jako preproprotein a jejich maturace je umožněna působením extraembryonálních proteáz tzv. konvertáz. U myši byly nalezeny dvě konvertázy, a to Spc1 a Spc4. Mutanti v obou genech mají narušenou funkci proteinu Nodal (Beck et al., 2002).

Nodal je zároveň inhibován proteiny z rodiny DAN/Cerberus. U drápatky vodní (*Xenopus laevis*) se jedná o geny *Cerberus* a *Coco* (Bell et al., 2003; Piccolo et al., 1999), u myši *Cerberus2/Cerberus-like/ Dand5* (Biben et al., 1998; Marques et al., 2004) a u dania byl tento gen nazván jako *charon* (Hashimoto et al., 2004).

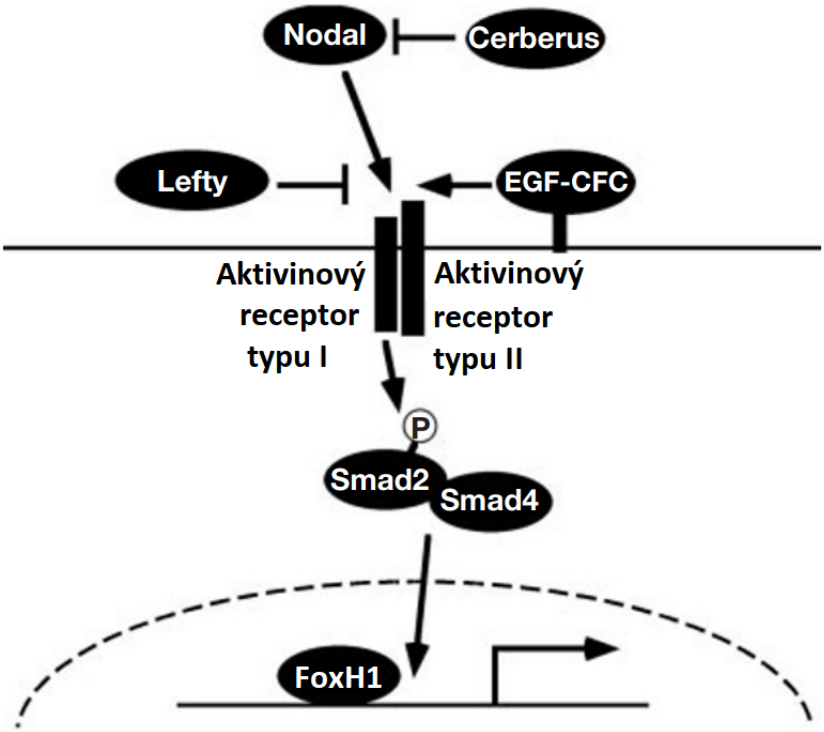
Přítomnost Nodal signálu je přijímána pomocí Aktivinových receptorů I (ActRIB/ALK4) a Aktivinových receptorů II (ActRIIA nebo ActRIIB) (viz Obrázek 6) (Gu et al., 1998; Jones et al., 1996; Oh and Li, 1997) a zároveň jejich koreceptory EGF-CFC (Epidermal growth factor – Cripto1 FRL1 Cryptic). Konktrétně u dania se jedná o koreceptor one-eyed pinhead (oep). *oep* je exprimován jak maternálně, tak zygoticky. Je nezbytný pro formování mezodermu i entodermu. Mutanti, kteří postrádají oba typy exprese, mají narušený vývoj organizátoru, formování zárodečného proužku a anterio-posteriorní polaritu (Gritsman et al., 1999; Schier et al., 1997).

[1] U jednotlivých zdrojů se názvy genů a proteinů Nodal kaskády rozcházejí v počátečních písmenech. Zároveň se názvy liší pro jednotlivé druhy. Z tohoto důvodu budu pro zjednodušení uvádět *nodal*, *pitx2* a *lefty*, když se jedná o geny, a Nodal, Pitx2 a Lefty, pokud se jedná o proteiny.

Aktivinové receptory fungují jako serin/threoninové kinázy. Tyto receptory zároveň interagují s Nodal inhibitorem Lefty (Thisse and Thisse, 1999). Aktivinový receptor typu II aktivuje Aktivinový receptor typu I, který způsobí fosforylaci transkripčních faktorů Smad (Gu et al., 1998; Oh and Li, 1997). Homologní receptor myšího Aktivinového receptoru I byl nalezen i u dania pruhovaného a nazván jako TARAM-A (Aoki et al., 2002).

Při fosforylaci Smad2 nebo Smad3 tyto proteiny vytvářejí komplex se Smad4. Tento komplex Smad proteinů aktivuje transkripční faktory FoxH1 (také označovány jako FAST) a proteiny z rodiny Mix (Germain et al., 2000; Nomura and Li, 1998; Yang et al., 1998). Mezi FoxH1 faktory a geny Nodal dráhy funguje pozitivní zpětná vazba, FoxH1 při akumulaci v jádře následně spouští transkripci genů *nodal*, *lefty* a *pitx2* (Juan and Hamada, 2001; Osada et al., 2000).

U dania pruhovaného jsou transkripční faktory FoxH1 kódovány tzv. *schmalspur* geny a u embryí jsou nezbytné jak maternální, tak zygotické. V nepřítomnosti jak maternálních, tak zygotických *schmalspur* genů dochází u embryí k defektům organizátoru gastrulace, tělních os a udržení exprese *nodal* genů (Pogoda et al., 2000).



Obrázek 6 Model Nodal signalizační kaskády. Nodal ligand je inhibován na základě interakce Lefty nebo Cerberus. Nodal interaguje s Aktivinovými receptory a EGF-CFC koreceptory. Aktivinové receptory typu I a II následně fosforylují transkripční faktory Smad 2/3, které oligomerizují se Smad4. Tento komplex Smad proteinů se dostává do jádra a zahajuje genovou expresi genů Nodal signalizační kaskády (převzato a upraveno podle Schier and Shen, 2000).

Jak již bylo zmíněno výše, různé skupiny obratlovců mají odlišný počet *nodal* genů. U myši se vyskytuje pouze jeden gen *Nodal*, který byl objeven jako první (Zhou et al., 1993). U plazů a ptáků byl nalezen jeho homolog *Nodal2* (Kajikawa et al., 2020). U drápatky vodní bylo nalezeno šest genů odvozených od genu *nodal – Xnr1-6* (Onuma et al., 2002), u kopinatce jeden *AmphiNodal* (Yu et al., 2002) a u dania a medaky *squint/Ndr1*, *cyclops/Ndr2* a *southpaw/Ndr3* (Feldman et al., 1998; Long et al., 2003). Zdá se, že *nodal* a geny od něho odvozené jsou u všech minimálně čelistnatých obratlovců odvozené od společného předka a jsou sesterské k *nodal* genům kopinatců a pláštěnců (Opazo et al., 2019).

Předpokládá se, že důvod, proč mají Teleostei tři *nodal* geny, kdežto savci pouze jeden, může spočívat v celogenomové duplikaci u této skupiny. Zdá se, že touto událostí se oddělily nejprve předchůdci genů *squint* a *cyclops*. *southpaw* následně vznikl od společného předchůdce s genem *squint*. Kromě dania a medaky byly tyto tři geny identifikovány i u čtverzubce zeleného (*Tetraodon nigroviridis*) a koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*), což podpořilo myšlenku společného výskytu těchto genů u všech zástupců Teleostei (Fan and Dougan, 2007).

nodal geny dania *squint* (*Ndr1*) a *cyclops* (*Ndr2*) se podílejí na tvorbě mezodermu, entodermu a taktéž vzniku organizátoru. Dvojití mutanti v těchto genech postrádají mezoderm v oblasti hlavy a trupu a mezodermální deriváty. Mutanti pouze v jednom z těchto dvou genů nemají tak závažné projevy, jelikož se předpokládá vzájemný funkční překryv těchto genů (Feldman et al., 1998).

Název genu *cyclops* je odvozen od kyklopie, patologického stavu vzniklého mutací v tomto genu, při které dochází k neoddělení očních důlků a vzniku pouze jednoho oka (Hatta et al., 1991; Blader and Strähle, 1998). *cyclops* se začíná exprimovat v časné gastrule v oblasti marginální zóny a jeho exprese je poté usměrněna na oblast embryonálního štítu. *cyclops* se dále exprimuje během střední gastrulace v oblasti paraxiálního mezodermu a chordamezodermu. Na konci gastrulace se však přestává exprimovat a následně se exprese obnoví na levé straně laterální mezodermální destičky (lateral plate mezoderm, LPM). U dania pruhovaného byla obnovená exprese tohoto genu nalezena ve stádiu kolem devatenácti somitů (Bisgrove et al. , 1999; Sampath et al., 1998). U medaky japonské byla pozorována asymetrická exprese v laterální mezodermální destičce a srdci během stádia dvanácti somitů (Soroldoni et al., 2007). V malé míře je exprimován i v levé straně mezimozku a podílí se na vývoji nervové soustavy (Hatta, et al., 1991; Rebagliati et al., 1998).

squint je exprimován maternálně a ve stádiu střední blastuly taktéž v dorzální oblasti marginální zóny. Byl detekován i v syncytiální vrstvě žloutku (Feldman et al., 1998). Z pozorování vyplývá, že Squint zároveň plní úlohu morfogenu a dokáže indukovat expresi i na velké vzdálenosti. U Cyclops však tato funkce nalezena nebyla (Chen and Schler, 2001). Squint byl zároveň detekován v DFC a Kupfferově váčku. Jeho exprese trvá do stádia kolem šesti až osmi somitů. Během pozdní somitogeneze se vyskytuje ve velké míře v levé habenule, v chordě a, na rozdíl od *cyclops*, pouze slabě v levé straně laterální mezodermální destičky (Bisgrove et al., 1999).

Třetím *nodal* genem u Teleostei je *southpaw* neboli *spaw*. U dania byla jeho prvotní exprese pozorována během čtyř až šesti somitového stádia, a to bilaterálně v oblasti u ocasního pupene. Jeho exprese v laterální mezodermální destičce se postupně rozšiřuje směrem od posterioru k anterioru. Asymetricky se začíná exprimovat ve stádiu deseti až dvanácti somitů, což z něj dělá první asymetricky exprimovaný marker ze všech *nodal* genů u dania (Long et al., 2003). Stejně tak to platí i pro medaku, kde byla pozorována prvotní exprese *spaw* v oblasti kolem KV a asymetrická exprese v laterální mezodermální destičce se začala objevovat již ve stádiu čtyř somitů. *spaw* se tedy exprimuje asynchronně v porovnání s genem *cyclops* a zároveň je jeho exprese synchronní s expresí genu *lefty* (Soroldoni et al., 2007). Při morfolinové blokaci *spaw* byla potvrzena jeho role při levo-pravé asymetrii srdce, slinivky břišní a dokonce i mezimozku (Long et al., 2003).

4.2 Lefty

Lefty patří, stejně jako Nodal, do rodiny TGFβ růstových faktorů, ale zároveň působí antagonisticky s ostatními členy této rodiny. Na rozdíl od většiny TGFβ růstových faktorů postrádá cysteinový zbytek nezbytný pro dimerizaci, díky tomu zřejmě působí jako monomer (Meno et al., 1996). U Teleostei bývají geny *lefty* taktéž označovány jako *Antiviny* (Thisse and Thisse, 1999). Lefty inhibuje aktivitu Nodal a přepokládá se, že s ním interaguje jednak na základě Aktivinové signalizace a zároveň nezávisle přes EGF-CFC koreceptory (Chen and Schen, 2004)

U dania pruhovaného stejně jako u myši byly identifikovány dva geny *lefty – lefty1* a *lefty2* (Bisgrove et al., 1999). Na rozdíl od dania, u medaky japonské byl nalezen pouze jeden gen *lefty*, plnící funkci *lefty1* i *lefty2* (Soroldoni et al., 2007). Stejně tak byl pouze jeden *lefty* nalezen u ostatních druhů ryb, a to u platýse a čtverzubce. Předpokládá se, že u savců je existence dvou genů *lefty* způsobena vlastní duplikací genu, nachází se totiž oba dva na jednom

chromozomu. Kdežto u Teleostei vznikly dva geny *lefty* opět díky celogenomové duplikaci. V rámci Teleostei následně došlo k sekundární ztrátě *lefty2* (Hashimoto et al., 2007).

lefty1 i *lefty2* se u dania začínají exprimovat na okraji blastodermu, přičemž *lefty1* je koncentrován na dorzální straně a na rozdíl od *lefty2* se takto exprimuje až do pozdní gastrulace. Dále se exprimují v dorzálním hypoblastu a prechordální destičce. Protein Lefty1 se zároveň vyskytuje v DFC, KV, habenule a posteriorní oblasti chordy. Během pozdní somitogeneze dochází k levo-pravě asymetrické expresi. *lefty2* se silně exprimuje v laterální mezodermální destičce a slabě v levé habenule a *lefty1* naopak slabě v laterální mezodermální destičce a silně v levé habenule (Bisgrove et al., 1999). Při narušení exprese *lefty1* morfolinem dochází k abnormalitám hlavy a chordy a oboustranné expresi *squint* a *pitx2* v laterální mezodermální destičce a mozku. Ztráta *lefty1* i *lefty2* vede k rozšíření mezodermu, ztrátě ektodermu a posílení aktivity Nodal proteinu (Feldman et al., 2002).

Pro expresi *lefty1* je nezbytná signalizace Fgf4, při knockdownu *Fgf4* byla pozorována ztráta exprese *lefty1* v posteriorní části chordy (Yamauchi et al., 2009).

4.3 Pitx2

Pitx2 je součástí bicoid-related homeobox transkripčích faktorů. Jedná se o downstream faktor v Nodal signalizační dráze, který je zodpovědný za realizaci levostranného vývoje (Logan et al., 1998). Jeho mutací dochází u člověka k autozomálně dominantnímu onemocnění nazývanému jako Riegerův syndrom, který způsobuje defekty ve vývoji očí, zubů a břišní dutiny (Alward et al., 1998; Semina et al., 1996). Stejně jako geny *nodal* a *lefty* se *pitx2* exprimuje asymetricky v levé laterální mezodermální destičce. Současně byla přítomnost *pitx2* nalezena na levé straně srdce, ve střevech a u ryb asymetricky i v mozku (Campione et al., 1999; Ryan et al., 1998). Pitx2 je pozitivně regulován funkcí Sonic Hedgehog a Nodal. Ektopická exprese *Sonic Hedgehog* způsobuje bilaterální expresi *pitx*2 v laterální mezodermální destičce. Mutanti v *pitx2* vykazují srdeční malformace, *situs inversus* nebo *heterotaxiii* (Piedra et al., 1998). Při experimentech na myších embryích byl při odstranění uzlu *pitx2* exprimován v laterální mezodermální destičce bilaterálně, nebo nebyl exprimován vůbec (Davidson et al., 1999).

U dania byly nalezeny dvě funkčně odlišné izoformy genu *pitx2 – pitx2a* a *pitx2c*, které se obě podílejí na formování mezodermu a asymetricky se exprimují. *pitx2c* se začíná exprimovat jako první, a to ve stádiu 40% epibolie, během gastrulace se objevuje v anteriorní i posteriorní prechordální destičce. Exprese *pitx2a* byla pozorována nejdříve ve stádiu farynguly v anteriorní prechordální destičce. Během pozdní somitogeneze se *pitx2c* asymetricky

exprimuje na dorzální straně mezimozku a ve střevech, zatímco *pitx2a* se asymetricky exprimuje v srdci (Essner et al., 2000). Při narušení exprese *pitx2* embrya dania vykazují menší velikost hlavy a očí a deformace v kraniofaciální oblasti (Yashiro et al., 2006).

Zajímavé je, že ačkoliv se *pitx2* u dania asymetricky exprimuje, a to především v laterální mezodermální destičce, u mutantů nebyly pozorovány defekty levo-pravé asymetrie ve vývoji střev a srdce. Ji et al. proto navrhli, že by zde jeho funkci mohl zastávat gen *elovl6*, který se také asymetricky exprimuje v laterální mezodermální destičce (Ji et al., 2016). Na druhé straně, u ostatních obratlovců, jako je například kuře, bylo prokázáno, že chybná exprese *pitx2* způsobuje laterální defekty (Logan et al., 1998).

4.4 Charon

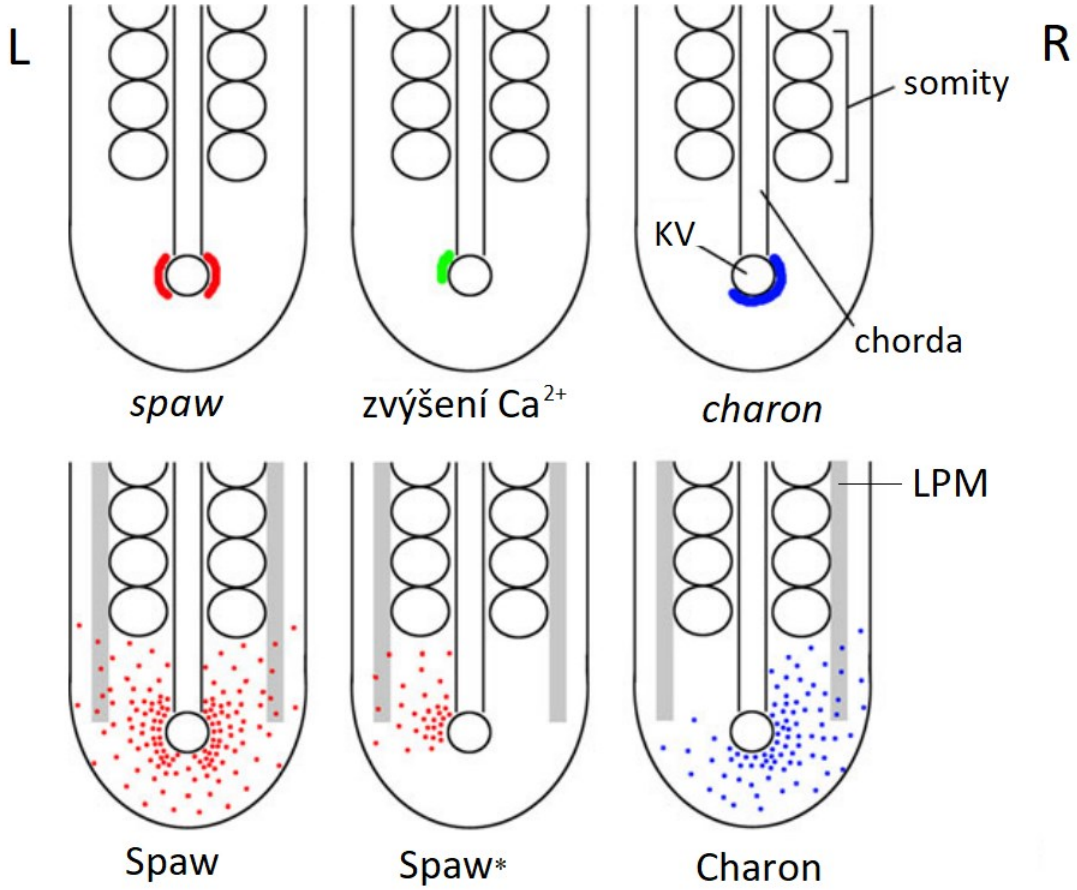
Charon patří do rodiny DAN/Cerberus faktorů, která je charakteristická svou doménou obsahující cystein. Studie u drápatky vodní ukázaly, že členové této rodiny antagonisticky interagují s TGFβ růstovými faktory. DAN proteiny negativně regulují Nodal, BMP a Wnt proteiny (Piccolo et al., 1999). Myší zástupce DAN faktorů Cerberus2/Cerberus-like potvrdil antagonistický vztah se členy Nodal signalizační kaskády. *Cerberus2* se exprimuje na pravé straně myšího organizátoru, kde inhibuje Nodal a bez jeho přítomnosti dochází u jedinců k laterálním defektům (Marques et al., 2004).

Charon byl nalezen u dania, medaky, čtverzubce a platýse (Hashimoto et al., 2004; Hojo et al., 2007). U dania pruhovaného byla exprese genu *charon* prvně detekována ve stádiu kolem dvou až tří somitů v hypoblastu. Nejsilněji byl exprimován v období deseti až dvanácti somitů. V každém stádiu se nacházel v blízkosti buněk Kupfferova váčku. Mutanti v tomto genu však vykazovali bilaterální expresi genů *spaw*, *lefty1*, *lefty2* a *pitx2* v laterální mezodermální destičce a mezimozku, čímž byla potvrzena jeho funkce v indukci levo-pravé asymetrie. Role Charon jako antagonisty těchto faktorů tak zřejmě probíhá v časném vývoji v blízkosti KV (Hashimoto et al., 2004).

U medaky japonské se gen *charon* začíná exprimovat ve stádiu šesti somitů, a to v oblasti Kupfferova váčku. Ve stádiu devíti somitů je jeho exprese asymetrická a nachází se výhradně v pravém dorzálním epitelu KV. Takto se *charon* exprimuje až do stádia čtrnácti somitů, kdy se jeho exprese začíná ztrácet (Hojo et al., 2007).

4.5 Ustanovení asymetrické exprese Nodal signalizační dráhy

Exprese genu *nodal* je zpočátku v KV bilaterální a až následně dochází k expresi pouze na levé straně (viz Obrázek 7). Tato asymetrická exprese je kromě interakce s Lefty umožněna díky výskytu antagonisty Nodal signalizační dráhy, a to proteinu Charon. *charon* se exprimuje na pravé straně v oblasti Kupfferova váčku a znemožňuje tak expresi *nodal* genů na pravé straně KV a zároveň i jejich pozdější výskyt na pravé straně laterální mezodermální destičky a mezimozku v pozdějších stádiích (Hojo et al., 2007; Soroldoni et al., 2007)



Obrázek 7 Přenos signálu z KV do levé LPM u medaky. *spaw* se nejprve exprimuje symetricky v KV (červeně), červené tečky pak znázorňují symetrickou difuzi Spaw v ocasní části embrya. Při zvýšení intracelulárních iontů vápníku (zeleně) se pak Spaw vyskytuje pouze na levé straně (Spaw*). *charon* se exprimuje na pravé straně KV a jeho proteinový produkt inhibuje expresi *spaw* tím, že Charon protein se naváže na Spaw ligand a následně pak Spaw nemůže aktivovat svou expresi na pravé straně LPM. L – levá strana, R – pravá strana (převzato a upraveno podle Matsui and Bessho, 2012)

Nodal se tedy vyskytuje nejprve v Kupfferově váčku a později se exprese přesouvá do levé strany laterální mezodermální destičky (lateral plate mezoderm, LPM) (Soroldoni et al., 2007). Jakým způsobem dojde k přesunu Nodal exprese z organizátoru do levé LPM není úplně jasné, ale předpokládá se, že přenos signálu je umožněn difuzí přímo Nodal ligandem z KV, který aktivuje expresi Nodal kaskády v levé LPM (Kawasumi et al., 2011; Saijoh et al., 2003).

Nodal funguje jako aktivátor exprese *pitx2* a sebe samého (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996). Taktéž aktivuje expresi genu *lefty*, který je zároveň jeho inhibitorem. Předpokládá se, že interakce Nodal a Lefty v LPM funguje jako Turingův reakčně-difúzní model (Turing, 1952). Tento model je založený na přítomnosti aktivátoru, který aktivuje sám sebe a má krátký dosah a jeho inhibitoru, který má dlouhý dosah. Nodal, jakožto aktivátor aktivuje vlastní expresi v levé LPM a současně expresi svého inhibitoru *lefty* na stejném místě. Zároveň mohou proteiny Nodal a Lefty volně difundovat (Saijoh et al., 2000; Juan and Hamada, 2001). Lefty má rychlejší difúzi a difunduje na velké vzdálenosti, díky čemuž dokáže inhibovat aktivitu Nodal ligandu na pravé straně a zamezuje tak zrcadlově duplikovanému vývoji levé strany (Müller et al., 2012; Sakuma et al., 2002).

Nakamura et al. (2006) předložili hypotézu, že tato regulace založená na pozitivní a negativní zpětnovazebné smyčce funguje jako SELI (self-enhancement and lateral-inhibition) systém. Exprese genu *nodal* je totiž zpočátku iniciována i na pravé straně, ale díky malým rozdílům v aktivačních signálech, které jsou způsobeny extracelulárním tokem, výsledně dochází k levostranně asymetrické expresi (Nakamura et al., 2006).

Výsledně jsou tedy geny *nodal*, *pitx2* a *lefty* exprimovány na levé straně embrya, a to především v levé laterální mezodermální destičce a díky proteinům z DAN rodiny nemohou být exprimovány na pravé straně. Při levo-pravě chybné expresi těchto genů dochází u embryí k porušení levo-pravé asymetrie těla a laterálním defektům (Blum et al., 2014).

5 Organizátor levo-pravé asymetrie u ne-teleostních skupin paprskoploutvých ryb

Ostatní skupiny ze třídy paprskoploutvých ryb (Actinopterygii), mezi které patří bichiři (Cladistia), chrupavčití (Chondrostei), kostlíni (Ginglymodi) a kaprouni (Halecomorphi) mají ve srovnání s Teleostei odlišný časný embryonální vývoj. U těchto skupin ryb dochází k holoblastickému rýhování, podobně jako u obojživelníků, zatímco u Teleostei dochází meroblastickému rýhování. Dalším rozdílem mezi Teleostei v porovnání s ne-teleostními skupinami je průběh gastrulace. Jak bylo již výše popsáno v kapitole o vzniku Kupfferova váčku, u Teleostei dochází ke gastrulaci na základě epibolie, kdežto u ne-teleostních skupin paprskoploutvých ryb probíhá gastrulace involucí (Cooper and Virta, 2007; Takeuchi et al., 2009).

Ani u jedné z těchto ne-teleostních skupin zatím nebyl zaznamenán levotočivý proud v organizátoru levo-pravé asymetrie, ale předpokládá se, že existuje a stejně jako u ostatních skupin obratlovců reguluje levo-pravou asymetrii těla, pro potvrzení však chybí dostatek dat (Blum et al., 2009).

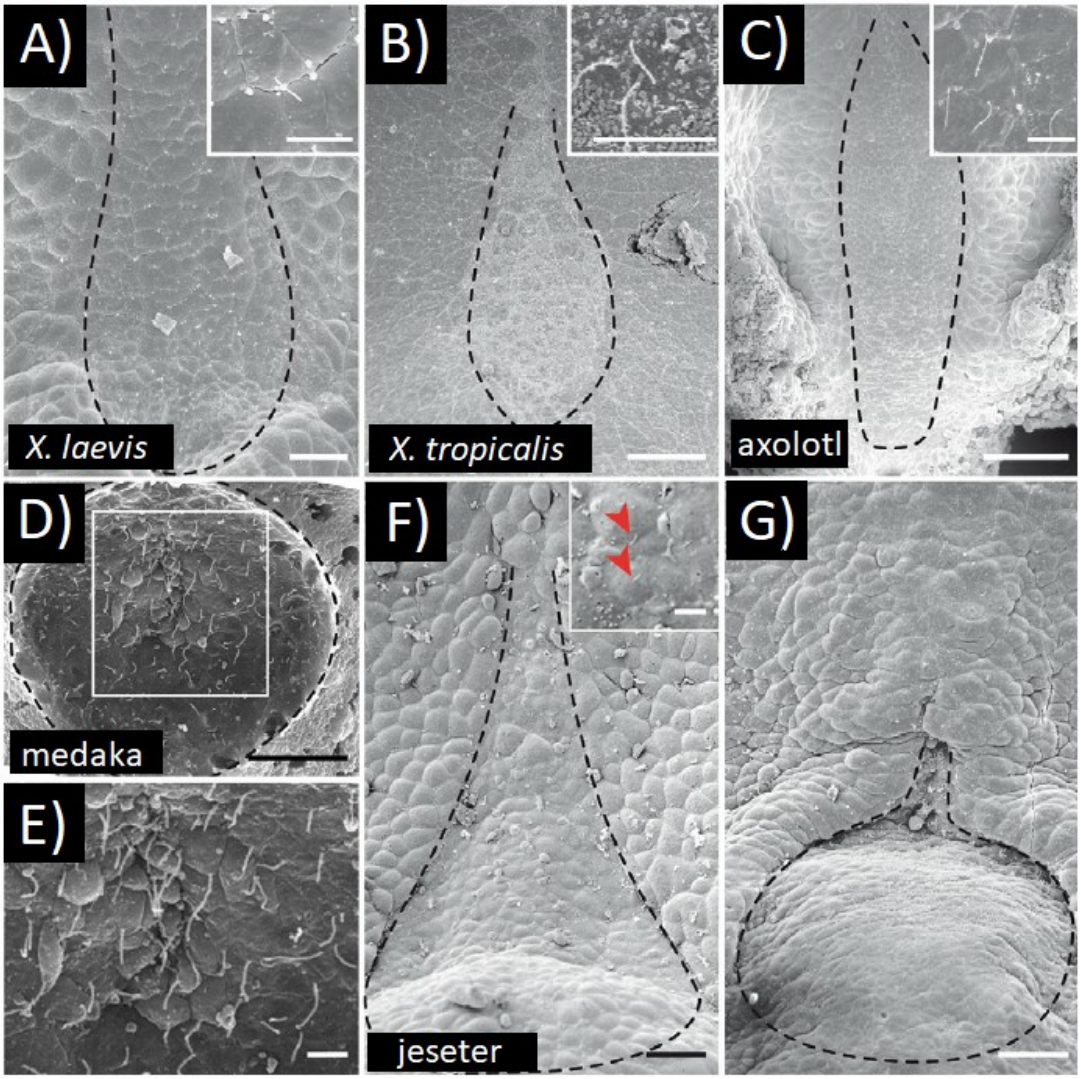
Nejpodrobnější vývoj tohoto orgánu zástupce z ne-teleostních ryb, byl popsán u jesetera bílého (*Acipenser transmontanus*). Pozorováním gastrulace byly potvrzeny podobné charakteristiky ve vývoji jesetera bílého a drápatky vodní. Stejně tak jako u obojživelníků i zde byla zaznamenána gastrocoelní střešní deska (gastrocoel roof plate), jakožto předpokládaný organizátor levo-pravé asymetrie (Bolker, 1993).

U drápatky vodní byl tento organizátor popsán jako přechodná trojúhelníkovitá struktura nacházející se na dorzálním povrchu v oblasti blastoporu, která je odvozena ze superficiálního mezodermu. Kolem stádia 14 se začínají objevovat pohyblivé řasinky. Stejně tak jako u ostatních obratlovců zde byl pozorován levotočivý tok, který je indukován přibližně 240-270 řasinkami, které se na rozdíl od KV vyskytují v rovině. (Schweickert et al., 2007; Shook et al., 2004). U jesetera bílého byla zaznamenána velmi podobná rovněž trojúhelníkovitá struktura kolem stádií 18-25, ve které byly také zaznamenány řasinky (Bolker, 1993).

Ačkoliv se u drápatky vyskytuje šest *nodal* genů, asymetrická exprese byla potvrzena pouze u *Xnr1*. Asymetricky se začíná exprimovat ve stádiích 17-19 na levé posteriorní části embrya a jako u teleostních *nodal* genů se později exprimuje v levé laterální mezodermální destičce (Lohr et al., 1997). Stejně tak jsou zde exprimovány geny *pitx2c*, *lefty1* a *lefty 2* (Meno et al., 1997; Schweickert et al., 2000). Na pravé straně je Xnr1 inhibován proteiny Cerberus a

Coco (Bell et al., 2003; Piccolo et al., 1999). Jaké je složení Nodal signalizační dráhy u ne-teleostních ryb a zda je průběh exprese této dráhy podobný jako u drápatky či Teleostei, není prozatím známo.

Na základě morfologické podobnosti se předpokládá, že původní organizátor u paprskoploutvých ryb je právě gastrocoelní střešní deska, ze které se u teleostních skupin vyvinul Kupfferův váček. Tato teorie podporuje myšlenku, že organizátory levo-pravé asymetrie u obratlovců jsou homologní struktury (viz Obrázek 8) (Blum et al., 2009). Srovnání vývoje a funkce organizátorů levo-pravé asymetrie u Teleostei a ne-teleostních ryb/obojživelníků tak může přinést cenné poznatky o původu Kupfferova váčku a evoluci regulace levo-pravé asymetrie u obratlovců.



Obrázek 8 Porovnání organizátorů levo-pravé asymetrie u obojživelníků (A-C), Teleostei (D,E) a ne-teleostních ryb (F,G)**.** A) gastrocoelní střešní deska (GRP) *Xenopus laevis* (stádium 18), B) GRP *Xenopus tropicalis* (stádium 15/16), C) GRP axolotla (stádium 17/18). D) Kupfferův váček u medaky, E) detail Kupfferova váčku s řasinkami. F) GRP u jesetera bílého ve stádiu 21, červené šipky ukazují přítomnost řasinek, G) GRP jesetera bílého ve stádiu 25. Měřítko A, B, F, G – 50 µm, C – 200 µm, E – 10 µm (převzato a upraveno podle Blum et al., 2009).

6 Závěr

Tato bakalářská práce se zaměřuje na vývoj a funkci Kupfferova váčku, jako nejvíce studovaného organizátoru levo-pravé asymetrie paprskoploutvých ryb. Jedná se o embryonální strukturu, typickou pro skupinu Teleostei, pocházející z tzv. „dorsal forerunner cells“ (DFC). Tyto buňky vznikají během epibolie z obalové vrstvy embrya, a to konkrétně z Wilsonových buněk.

DFC podstupují ingresi a postupně vytvářejí dutou růžicovitou strukturu tvořenou ciliárními buňkami. Řasinky těchto buněk rotují a generují levotočivý proud extracelulární tekutiny, který indukuje následnou genovou expresi. Jak je tok tekutiny vnímán buňkami organizátoru však není doposud zcela objasněno. Po indukci extracelulárního proudu buňky organizátoru podstupují epitelo-mesenchymální tranzici a podílejí se na vzniku chordy a svalů.

Díky levotočivému toku dochází v organizátorech k iniciaci tzv. Nodal signalizační kaskády, která je nezbytná pro determinaci levo-pravé asymetrie těla. Mezi hlavní členy této dráhy patří geny *nodal*, *lefty* a *pitx2*. Tyto geny se exprimují na levé straně laterální mezodermální destičky a vzájemně spolu interagují. Protein Nodal pozitivně reguluje svou vlastní expresi a expresi Lefty, který ho zároveň inhibuje. Proteiny Nodal signalizační dráhy jsou zároveň inhibovány Nodal antagonistou Charon, který znemožňuje jejich expresi na pravé straně. U různých druhů obratlovců se vyskytuje rozdílný počet *nodal* genů, u Teleostei byly objeveny tři homology, a to *squint*, *cyclops* a *southpaw*. Nesprávná exprese genů Nodal signalizační kaskády následně vyvolává laterální defekty ve vnitřních orgánech jako jsou srdce, střeva nebo mozek.

Na rozdíl od teleostních zástupců, u ne-teleostních skupin ryb se namísto Kupfferova váčku vyskytuje organizátor označovaný jako gastrocoelní střešní deska, který je více podobný organizátoru obojživelníků. Tato struktura byla doposud pozorována pouze u jesetera bílého. Budoucí výzkum by mohl prokázat výskyt stejné struktury u dalších ne-teleostních skupin paprskoploutvých ryb a taktéž potvrdit, zda se zde stejně jako u ostatních organizátorů levo-pravé asymetrie vyskytuje levotočivý proud spouštějící levostrannou aktivaci Nodal dráhy. Na základě morfologických podobností se předpokládá, že Kupfferův váček vznikl jako odvozená struktura právě z gastrocoelní střešní desky. Následující studie by tak mohly porovnat organizátory levo-pravé asymetrie u sesterských skupin Teleostei a případně identifikovat organizátory, které by mohly být morfologicky označeny jako mezistupně mezi těmito strukturami.

7 Seznam zkratek

ActRIB	Activine receptor type I B
ActRIIA	Activine recepror type II A
ActRIIB	Activin receptor type II B
ALK4	Activine receptor-like kinase 4
CAMK-II	Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II
Cftr	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Dand5	DAN domain family member 5
DFC	dorsal forerunner cells
Dnahc5	dynein axonemal heavy chain 5
EGF-CFC	Epidermal growth factor – Cripto1 FRL1 Cryptic
elovl6	ELOVL fatty acid enongase 6
FAST	Fas activated serin/thereonin kinase
FGF	fibroblast growth factor
FoxH1	Forkhead box H1
Foxj1	Forkhead box J1
KAP3	Kinesin associate protein 3
KIF3A	Kinesin family member 3 A
KIF3B	Kinesin family member 3 B
KV	Kupffer´s vesicle
KVDCs	KV derived cells
Lefty	Left-right determination factor
Lgl2	lethal giant larvae 2
LPM	lateral plate mezoderm
Lrd	left-right dynein
Lrdr1	left-right dynein-related 1
nc-Wnt	non-canonical Wnt
Ndr1	Nodal related 1
Ndr2	Nodal related 2
Ndr3	Nodal related 3
Nodal	Nodal growth differention factor
Ntl	No tail
oep	one-eyed pinhead

PCP	planar cell polarity
Pdk2	polycystin-2
Pitx2	Paired-like homeodomain transcription factor 2
Rab11a	Ras-related protein Rab-11 a
Rock2b	rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2 b
RYR3	ryanodine receptor 3
Spc1	Sparse coat 1
Spc4	Sparse coat 4
TARAM-A	Tar type I receptor kinase
Tbx16	T-box tranctiption factor 16
TGFβ	Transforming growth factor β
Vangl2	Van Gogh like 2
Wnt	Wingless/Int-1
Xnr	Xenopus nodal-related

8 Použitá literatura

Adams, D.S., Robinson, K.R., Fukumoto, T., Yuan, S., Albertson, R.C., Yelick, P., Kuo, L., McSweeney, M., and Levin, M. (2006). Early, H+-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. Development *133*, 1657–1671.

Afzelius, B.A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. Obstet. Gynecol. Surv. *32*, 49–50.

Alward, W. L. M., Semina, E. V., Kalenak, J. W., Héon, E., Sheth, B. P., Stone, E. M., & Murray, J. C. (1998). Autosomal dominant iris hypoplasia is caused by a mutation in the rieger syndrome (*rieg/pitx2*) gene. Am. J. of Ophthal. *125*, 98–100.

Amack, J.D. (2021). Cellular dynamics of EMT: lessons from live in vivo imaging of embryonic development. Cell Commun. Signal. *19*, 1–16.

Amack, J.D., Wang, X., and Yost, H.J. (2007). Two T-box genes play independent and cooperative roles to regulate morphogenesis of ciliated Kupffer's vesicle in zebrafish. Dev. Biol. *310*, 196–210.

Amack, J. D., & Yost, H. J. (2004). The T Box Transcription Factor No Tail in Ciliated Cells Controls Zebrafish Left-Right Asymmetry. Curr. Biol. *14*, 685–690.

Anderson, M.P., Gregory, R.J., Thompson, S., Souza, D.W., Paul, S., Mulligan, R.C., Smith, A.E., and Welsh, M.J. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. Science *253*, 202–205.

Aoki, T.O., Mathieu, J., Saint-Etienne, L., Rebagliati, M.R., Peyriéras, N., and Rosa, F.M. (2002). Regulation of nodal signalling and mesendoderm formation by TARAM-A, a TGFβ-related type I receptor. Dev. Biol. *241*, 273–288.

Babb, S.G., and Marrs, J.A. (2004). E-cadherin regulates cell movements and tissue formation in early zebrafish embryos. Dev. Dyn. *230*, 263–277.

Bagnat, M., Navis, A., and Marjoram, L. (2013). Cftr controls lumen expansion and function of Kupffer's vesicle in zebrafish. Developmet *140*, 1703–1712.

Ballard, W.W. (1976). Normal embryonic stages for salmonid fishes based on Salmo gairdneri, and Salvelinus fontinalis. J. Exp. Zool. *184*, 7–26.

Beck, S., Le Good, J.A., Guzman, M., Haim, N. Ben, Roy, K., Beermann, F., and Constam, D.B. (2002). Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. Nat. Cell Biol. *4*, 981–985.

Bell, E., Muñoz-Sanjuán, I., Altmann, C.R., Vonica, A., and Brivanlou, A.H. (2003). Cell fate specification and competence by Coco, a maternal BMP, TGFβ and Wnt inhibitor. Development *130*, 1381–1389.

Bellomo, D., Lander, A., Harragan, L., and Brown, N.A. (1996). Cell proliferation in mammalian gastrulation: The ventral node and notochord are relatively quiescent. Dev. Dyn. *205*, 471–485.

Biben, C., Stanley, E., Fabri, L., Kotecha, S., Rhinn, M., Drinkwater, C., Lah, M., Wang, C.C., Nash, A., Hilton, D., et al. (1998). Murine Cerberus homologue mCer-1: A candidate anterior patterning molecule. Dev. Biol. *194*, 135–151.

Bisgrove, B.W., Essner, J.J., and Yost, H.J. (1999). Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling. Development *126*, 3253–3262.

Bisgrove, B.W., Snarr, B.S., Emrazian, A., and Yost, H.J. (2005). Polaris and Polycystin-2 in dorsal forerunner cells and Kupffer's vesicle are required for specification of the zebrafish left-right axis. Dev. Biol. *287*, 274–288.

Blader, P., and Strähle, U. (1998). Casting an eye over cyclopia. Nature *395*, 112–113.

Blum, M., Weber, T., Beyer, T., and Vick, P. (2009). Evolution of leftward flow. Semin. Cell Dev. Biol. *20*, 464–471.

Blum, M., Feistel, K., Thumberger, T., and Schweickert, A. (2014). The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. Development *141*, 1603–1613.

Bolker, J.A. (1993). Gastrulation and mesoderm morphogenesis in the white sturgeon. J. Exp. Zool. *266*, 116–131.

Borovina, A., Superina, S., Voskas, D., and Ciruna, B. (2010). Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. Nat. Cell Biol. *12*, 407−412.

Brummett, A.R., and Dumont, J.N. (1978). Kupffer's vesicle in *Fundulus heteroclitus*: A scanning and transmission electron microscope study. Tissue Cell *10*, 11–22.

Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., Van Bebber, F., Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R., et al. (1999). The homeobox gene Pitx2: Mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. Development *126*, 1225–1234.

Caron, A., Xu, X., and Lin, X. (2012). Wnt/β-catenin signaling directly regulates *Foxj1* expression and ciliogenesis in zebrafish Kupffer's vesicle. Development *139*, 514–524.

Chen, Y., and Schler, A.F. (2001). The zebrafish nodal signal Squint functions as a morphogen. Nature 411, 607–610.

Chen, C., and Shen, M. M. (2004). Two Modes by which Lefty Proteins Inhibit Nodal Signaling. Curr. Biol, *14*, 618–624.

Collignon, J., Varlet, I., and Robertson, E.J. (1996). Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. Nature *381*, 155–158.

Concha, M.L., and Wilson, S.W. (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. J. Anat. *199*, 63–84.

Conlon, F.L., Lyons, K.M., Takaesu, N., Barth, K.S., and Kispert, A. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of primitive streak in mouse Development *120*, 1919–1928.

Cooke, J. (1995). Vertebrate embryo handedness. Nature *374*, 681.

Cooper, M.S., and D'Amico, L.A. (1996). A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation. Dev. Biol. *180*, 184–198.

Cooper, M.S., and Virta, V.C. (2007). Evolution of gastrulation in the ray-finned (actinopterygian) fishes. J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol. *308*, 591–608.

Dasgupta, A., and Amack, J.D. (2016). Cilia in vertebrate left - Right patterning. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *371*, 20150410.

Davidson, B.P., Kinder, S.J., Steiner, K., Schoenwolf, G.C., and Tam, P.P.L. (1999). Impact of node ablation on the morphogenesis of the body axis and the lateral asymmetry of the mouse embryo during early organogenesis. Dev. Biol. *211*, 11–26.

Essner, J.J., Branford, W.W., Zhang, J., and Yost, H.J. (2000). Mesendoderm and left-right brain heart and gut development are differentially regulated by pitx2 izoforms. Development *127*, 1081–1093.

Essner, J.J., Vogan, K.J., Wagner, M.K., Tabin, C.J., Yost, H.J., and Brueckner, M. (2002). Conserved function for embryonic nodal cilia. Nature *418*, 37–38.

Essner, J.J., Amack, J.D., Nyholm, M.K., Harris, E.B., and Yost, H.J. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. Development *132*, 1247–1260.

Fan, X., and Dougan, S.T. (2007). The evolutionary origin of nodal-related genes in teleosts. Dev. Genes Evol. *217*, 807–813.

Feistel, K., and Blum, M. (2006). Three types of cilia including a novel 9+4 axoneme on the notochordal plate of the rabbit embryo. Dev. Dyn. *235*, 3348–3358.

Feldman, B., Concha, M.L., Saúde, L., Parsons, M.J., Adams, R.J., Wilson, S.W., and Stemple, D.L. (2002). Lefty antagonism of Squint is essential for normal gastrulation. Curr. Biol. *12*, 2129–2135.

Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Talbot, W. S. (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. Nature *395*, 181–185.

Ferreira, R.R., Fukui, H., Chow, R., Vilfan, A., and Vermot, J. (2019). The cilium as a force sensor-myth versus reality. J. Cell Sci. *132*, jcs213496.

Francescatto, L., Rothschild, S.C., Myers, A.L., and Tombes, R.M. (2010). The activation of membrane targeted CaMK-II in the zebrafish Kupffer's vesicle is required for left-right asymmetry. Development *137*, 2753–2762.

Germain, S., Howell, M., Esslemont, G.M., and Hill, C.S. (2000). Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. Genes Dev. *14*, 435–451.

Gokey, J.J., Dasgupta, A., and Amack, J.D. (2015). The V-ATPase accessory protein Atp6ap1b mediates dorsal forerunner cell proliferation and left – right asymmetry in zebrafish. Dev. Biol. *407*, 115–130.

Gokey, J.J., Ji, Y., Tay, H.G., Litts, B., and Amack, J.D. (2016). Kupffer's vesicle size threshold for robust left-right patterning of the zebrafish embryo. Dev. Dyn. *245*, 22–33.

González-Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A.E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P.C., Reisin, I.L., Arnaout, M.A., and Cantiello, H.F. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca2+-permeable nonselective cation channel. Proc. Natl. Acad. Sci. *98*, 1182–1187.

Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W.S., and Schier, A.F. (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. Cell *97*, 121−132.

Gu, Z., Nomura, M., Simpson, B.B., Lei, H., Feijen, A., Van Den Eijnden-Van Raaij, J., Donahoe, P.K., and Li, E. (1998). The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. Genes Dev. *12*, 844–857.

Hatta, K., Kimmel, C. B., Ho, R. K., & Walker, C. (1991). The cyclops mutation blocks specification of the floor plate of the zebrafish central nervous system. Nature *350*, 339–341.

Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V.P., Guggino, W.B., and Germino, G.G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. Nature *408*, 990–994.

Hashimoto, H., Rebagliati, M., Ahmad, N., Muraoka, O., Kurokawa, T., Hibi, M., and Suzuki, T. (2004). The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish. Development *131*, 1741–1753.

Hashimoto, H., Uji, S., Kurokawa, T., Washio, Y., and Suzuki, T. (2007). Flounder and fugu have a single *lefty* gene that covers the functions of *lefty1* and *lefty2* of zebrafish during L-R patterning. Gene *387*, 126–132.

Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., and Takeda, S. (2006). Nodal Flow and the Generation of Left-Right Asymmetry. Cell *125*, 33–45.

Hojo, M., Takashima, S., Kobayashi, D., Sumeragi, A., Shimada, A., Tsukahara, T., Yokoi, H., Narita, T., Jindo, T., Kage, T., et al. (2007). Right-elevated expression of *charon* is regulated by fluid flow in medaka Kupffer's vesicle. Dev. Growth Differ. *49*, 395–405.

Ikeda, T., Inamori, K., Kawanishi, T., and Takeda, H. (2022). Reemployment of Kupffer's vesicle cells into axial and paraxial mesoderm via transdifferentiation. Dev. Growth Differ. *00,* 1–15.

Ji, Y., Buel, S.M., and Amack, J.D. (2016). Mutations in zebrafish pitx2 model congenital malformations in Axenfeld-Rieger syndrome but do not disrupt left-right placement of visceral organs. Dev. Biol. *416*, 69–81.

Jones, C.M., Armes, N., and Smith, J.C. (1996). Signalling by TGF-β family members: Short-Range effects of Xnr-2 and BMP-4 contrast with the long-range effects of activin. Curr. Biol. *6*, 1468–1475.

Juan, H., and Hamada, H. (2001). Roles of nodal-lefty regulatory loops in embryonic patterning of vertebrates. Genes to Cells *6*, 923–930.

Kajikawa, E., Horo, U., Ide, T., Mizuno, K., Minegishi, K., Hara, Y., Ikawa, Y., Nishimura, H., Uchikawa, M., Kiyonari, H., et al. (2020). Nodal paralogues underlie distinct mechanisms for visceral left–right asymmetry in reptiles and mammals. Nat. Ecol. Evol. *4*, 261–269.

Kamura, K., Kobayashi, D., Uehara, Y., Koshida, S., Iijima, N., Kudo, A., Yokoyama, T., and Takeda, H. (2011). Pkd1l1 complexes with Pkd2 on motile cilia and functions to establish the left-right axis. Development *138*, 1121–1129.

Kawasumi, A., Nakamura, T., Iwai, N., Yashiro, K., Saijoh, Y., Belo, J.A., Shiratori, H., and Hamada, H. (2011). Left-right asymmetry in the level of active Nodal protein produced in the node is translated into left-right asymmetry in the lateral plate of mouse embryos. Dev. Biol. *353*, 321–330.

Kimmel, C.B., Warga, R.M., and Schilling, T.F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. Development *108*, 581–594.

Kramer-Zucker, A.G., Olale, F., Haycraft, C.J., Yoder, B.K., Schier, A.F., and Drummond, I.A. (2005). Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. Development *132*, 1907–1921.

Kreiling, J.A., Prabhat, Williams, G., and Creton, R. (2007). Analysis of Kupffer's vesicle in zebrafish embryos using a cave automated virtual environment. Dev. Dyn. *236*, 1963–1969.

Kupffer, C. (1868). Beobachtungen fiber die Entwicklung. Anatomie 209–272.

Logan, M., Pagán-Westphal, S.M., Smith, D.M., Paganessi, L., and Tabin, C.J. (1998). The transcription factor pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. Cell *94*, 307–317.

Lohr, J.L., Danos, M.C., and Yost, H.J. (1997). Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development. Development *124*, 1465–1472.

Long, S., Ahmad, N., and Rebagliati, M. (2003). The zebrafish nodal-related gene *southpaw* is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. Development *130*, 2303–2316.

Lopes, S.S., Lourenço, R., Pacheco, L., Moreno, N., Kreiling, J., and Saúde, L. (2010). Notch signalling regulates left-right asymmetry through ciliary length control. Development *137*, 3625–3632.

Lowe, L. A., Supp, D. M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C. V. E., Potter, S. S., Overbeek, P., and Kuehn, M. R. (1996). Conserved left–right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. Nature *381*, 158–16.

Männer, J. (2001). Does an equivalent of the “ventral node” exist in chick embryos? A scanning electron microscopic study. Anat. Embryol. *204*, 481–490.

Marques, S., Borges, A.C., Silva, A.C., Freitas, S., Cordenonsi, M., and Belo, J.A. (2004). The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis. Genes Dev. *18*, 2342–2347.

Matsui, T., and Bessho, Y. (2012). Left-right asymmetry in zebrafish. Cell. Mol. Life Sci. *69*, 3069–3077.

McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., and Brueckner, M. (2003). Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. Cell *114*, 61–73.

Melby, A.E., Warga, R.M., and Kimmel, C.B. (1996). Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula. Development *122*, 2225–2237.

Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y., and Hamada, H. (1996). Left-right asymmetric expression of the TGFβ-family member *lefty* in mouse embryos. Nature *381*, 151–155.

Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S., and Hamada, H. (1997). Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. Genes to Cells *2*, 513–524.

Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., et al. (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. Science *272*, 1339–1342.

Müller, P., Rogers, K.W., Jordan, B.M., Lee, J.S., Robson, D., Ramanathan, S., and Schier, A.F. (2012). Differential diffusivity of nodal and lefty underlies a reaction-diffusion patterning system. Science *336*, 721–724.

Nakamura, T., and Hamada, H. (2012). Left-right patterning: Conserved and divergent mechanisms. Dev. *139*, 3257–3262.

Nakamura, T., Mine, N., Nakaguchi, E., Mochizuki, A., Yamamoto, M., Yashiro, K., Meno, C., and Hamada, H. (2006). Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system. Dev. Cell *11*, 495–504.

Neugebauer, J.M., Amack, J.D., Peterson, A.G., Bisgrove, B.W., and Yost, H.J. (2009). FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. Nature *458*, 651–654.

Nomura, M., and Li, E. (1998). Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. Nature *393*, 786–790.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. Cell *95*, 829–837.

Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. Nature *418*, 96–99.

Oh, S.P., and Li, E. (1997). The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. Genes Dev. *11*, 1812−1826.

Okabe, N., Xu, B., and Burdine, R.D. (2008). Fluid dynamics in zebrafish Kupffer's vesicle. Dev. Dyn. *237*, 3602–3612.

Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Belmonte, J.C.I., and Hirokawa, N. (2005). Mechanism of nodal flow: A conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. Cell *121*, 633–644.

Olbrich, H., Häffner, K., Kispert, A., Völkel, A., Volz, A., Sasmaz, G., Reinhardt, R., Hennig, S., Lehrach, H., Konietzko, N., et al. (2002). Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. Nat. Genet. *30*, 143–144.

Onuma, Y., Takahashi, S., Yokota, C., and Asashima, M. (2002). Multiple nodal-related genes act coordinately in *Xenopus* embryogenesis. Dev. Biol. *241*, 94–105.

Opazo, J.C., Kuraku, S., Zavala, K., Toloza-Villalobos, J., and Hoffmann, F.G. (2019). Evolution of nodal and nodal-related genes and the putative composition of the heterodimers that trigger the nodal pathway in vertebrates. Evol. Dev. *21*, 205–217.

Oppenheimer, J.M. (1936) Processes of localization in developing *fundulus*. J. Exp. Zool. *73*, 405–444.

Osada, S.I., Saijoh, Y., Frisch, A., Yeo, C.Y., Adachi, H., Watanabe, M., Whitman, M., Hamada, H., and Wright, C.V.E. (2000). Activin/Nodal responsiveness and asymmetric expression of a Xenopus nodal-related gene converge on a FAST-regulated module in intron 1. Development *127*, 2503–2514.

Oteíza, P., Köppen, M., Concha, M.L., and Heisenberg, C.P. (2008). Origin and shaping of the laterality organ in zebrafish. Development *135*, 2807–2813.

Park, T.J., Mitchell, B.J., Abitua, P.B., Kintner, C., and Wallingford, J.B. (2008). Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. Nat. Genet. *40*, 871–879.

Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M., and Dworniczak, B. (2002). The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. Curr. Biol. *12*, 938–943.

Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., and De Robertis, E.M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. Nature *397*, 707–710.

Piedra, M.E., Icardo, J.M., Albajar, M., Rodriguez-Rey, J.C., and Ros, M.A. (1998). Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left- right asymmetry. Cell *94*, 319–324.

Pogoda, H.M., Solnica-Krezel, L., Driever, W., and Meyer, D. (2000). The zebrafish forkhead transcription factor FoxH1/Fast1 is a modulator of Nodal signaling required for organizer formation. Curr. Biol. *10*, 1041–1049.

Qian, F., Germino, F. J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S., & Germino, G. G. (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. Nat. Genet. *16*, 179–183.

Rebagliati, M.R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P., and Dawid, I.B. (1998). Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. Dev. Biol. *199*, 261–272.

Row, R.H., Tsotras, S.R., Goto, H., and Martin, B.L. (2016). The zebrafish tailbud contains two independent populations of midline progenitor cells that maintain long-term germ layer plasticity and differentiate in response to local signaling cues. Development *143*, 244−254.

Ryan, A.K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., De La Peña, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., et al. (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. Nature *394*, 545–551.

Saijoh, Y., Adachi, H., Sakuma, R., Yeo, C.Y., Yashiro, K., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Kawabata, M., et al. (2000). Left-right asymmetric expression of lefty2 and nodal is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor FAST2. Mol. Cell *5*, 35–47.

Saijoh, Y., Oki, S., Ohishi, S., and Hamada, H. (2003). Left-right patterning of the mouse lateral plate requires Nodal produced in the node. Dev. Biol. *256*, 161–173.

Sakuma, R., Ohnishi, Y.I., Meno, C., Fujii, H., Juan, H., Takeuchi, J., Ogura, T., Li, E., Miyazono, K., and Hamada, H. (2002). Inhibition of Nodal signalling by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion. Genes to Cells *7*, 401–412.

Sampaio, P., Ferreira, R.R., Guerrero, A., Pintado, P., Tavares, B., Amaro, J., Smith, A.A., Montenegro-Johnson, T., Smith, D.J., and Lopes, S.S. (2014). Left-right organizer flow dynamics: How much cilia activity reliably yields laterality? Dev. Cell *29*, 716–728.

Sampath, K., Rubinstein, A. L., Cheng, A. M. S., Liang, J. O., Fekany, K., Solnica-Krezel, L., Korzh, V., Halpern, M. E., Wright, C. V. E. (1998). Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. Nature *395*, 185–189.

Sarmah, B., Latimer, A.J., Appel, B., and Wente, S.R. (2005). Inositol polyphosphates regulate zebrafish left-right asymmetry. Dev. Cell *9*, 133–145.

Satir, P., and Christensen, S.T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. Annu. Rev. Physiol. *69*, 377–400.

Semina, E. V., Reiter, R., Leysens, N. J., Alward, W. L. M., Small, K. W., Datson, N. A., Siegel-Bartelt, J., Bierke-Nelson, D., Bitoun, P., Zabel, P. U., Carey, J. C., Murray, J. C. (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. Nat. Genet. *14*, 392–399.

Schier, A.F., and Shen, M.M. (2000). Nodal signalling in vertebrate development. Nature *403*, 385–389.

Schier, A.F., Neuhauss, S.C.F., Helde, K.A., Talbot, W.S., and Driever, W. (1997). The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail. Development *124*, 327–342.

Schweickert, A., Campione, M., Steinbeisser, H., and Blum, M. (2000). Pitx2 isoforms: Involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. Mech. Dev. *90*, 41–51.

Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K., and Blum, M. (2007). Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in *Xenopus*. Curr. Biol. *17*, 60–66.

Shinohara, K., Kawasumi, A., Takamatsu, A., Yoshiba, S., Botilde, Y., Motoyama, N., Reith, W., Durand, B., Shiratori, H., and Hamada, H. (2012). Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. Nat. Commun. *3*.

Shiratori, H., and Hamada, H. (2006). The left-right axis in the mouse: From origin to morphology. Development *133*, 2095–2104.

Shook, D.R., Majer, C., and Keller, R. (2004). Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. Dev. Biol. *270*, 163–185.

Soroldoni, D., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., and Czerny, T. (2007). Dynamic expression pattern of Nodal-related genes during left-right development in medaka. Gene Expr. Patterns *7*, 93–101.

Spemann, H., and Mangold, H. (1924). über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. Arch. Für Mikroskopische Anat. Und Entwicklungsmechanik *100*, 599–638.

Stubbs, J.L., Oishi, I., Izpisúa Belmonte, J.C., and Kintner, C. (2008). The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. Nat. Genet. *40*, 1454−1460.

Sulik, K., Dehart, D.B., Inagaki, T., Carson, J.L., Vrablic, T., Gesteland, K., and Schoenwolf, G.C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. Dev. Dyn. *201*, 260–278.

Supek, F., Supekova, L., Mandiyan, S., Pan, Y.C.E., Nelson, H., and Nelson, N. (1994). A novel accessory subunit for vacuolar H+-ATPase from chromaffin granules. J. Biol. Chem. *269*, 24102–24106.

Supp, D.M., Witte, D.P., Steven Potter, S., and Brueckner, M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. Nature *389*, 963–966.

Tabin, C. (2005). Do we know anything about how left-right asymmetry is first established in the vertebrate embryo? J. Mol. Histol. *36*, 317–323.

Takeuchi, M., Takahashi, M., Okabe, M., and Aizawa, S. (2009). Germ layer patterning in bichir and lamprey; an insight into its evolution in vertebrates. Dev. Biol. *332*, 90–102.

Tanaka, Y., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. Nature *435*, 172–177.

Tay, H.G., Schulze, S.K., Compagnon, J., Foley, F.C., Heisenberg, C.P., Yost, H.J., Abdelilah-Seyfried, S., and Amack, J.D. (2013). Lethal giant larvae 2 regulates development of the ciliated organ Kupffer's vesicle. Development *140*, 1550–1559.

Thisse, C., and Thisse, B. (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGFβ superfamily, negatively regulates mesoderm induction. Development *126*, 229–240.

Trinkaus, J.P. (1984). Mechanism of *Fundulus* epiboly - a current view. Integr. Comp. Biol. *24*, 673–688.

Turing, A. M. (1952). The chemical basis of morphogenesis. Phil. Trans. R. Soc. Biol. Science *237*, 37–72.

Wang, G., Cadwallader, A.B., Jang, D.S., Tsang, M., Yost, H.J., and Amack, J.D. (2011). The Rho kinase rock2b establishes anteroposterior asymmetry of the ciliated Kupffer's vesicle in zebrafish. Development *138*, 45–54.

Wang, G., Manning, M.L., and Amack, J.D. (2012). Regional cell shape changes control form and function of Kupffer's vesicle in the zebrafish embryo. Dev. Biol. *370*, 52–62.

Warga, R.M., and Kane, D.A. (2007). A role for N-cadherin in mesodermal morphogenesis during gastrulation. Dev. Biol. *310*, 211–225.

Warga, R.M., and Kane, D.A. (2018). Wilson cell origin for Kupffer's vesicle in the zebrafish. Dev. Dyn. *247*, 1057–1069.

Westlake, C.J., Baye, L.M., Nachury, M. V., Wright, K.J., Ervin, K.E., Phu, L., Chalouni, C., Beck, J.S., Kirkpatrick, D.S., Slusarski, D.C., et al. (2011). Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPPII) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 2759−2764.

Yamauchi, H., Miyakawa, N., Miyake, A., and Itoh, N. (2009). Fgf4 is required for left-right patterning of visceral organs in zebrafish. Dev. Biol. *332*, 177–185.

Yang, X., Li, C., Xu, X., and Deng, C. (1998). The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 3667–3672.

Yashiro, K., Shen, M.M., Shiratori, H., and Hamada, H. (2006). Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs. Development *133*, 3015−3025.

Yu, J.K., Holland, L.Z., and Holland, N.D. (2002). An amphioxus nodal gene (*AmphiNodal*) with early symmetrical expression in the organizer and mesoderm and later asymmetrical expression associated with left-right axis formation. Evol. Dev. *4*, 418–425.

Yu, X., Ng, C.P., Habacher, H., and Roy, S. (2008). Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. Nat. Genet. *40*, 1445–1453.

Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L.M., and Kuehn, M.R. (1993). *Nodal* is a novel TGF-β-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. Nature *361*, 543–547.