UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra zoologie

Srovnání migrace a morfogeneze neurální lišty u evolučně důležitých zástupců paprskoploutvých ryb s cílem charakterizovat vývojové zdroje kraniofaciální diverzity

Comparison of migration and morphogenesis of neural crest cells in Ray-finned fishes: towards identification of developmental sources of craniofacial diversity

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Jan Štundl

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Robert Černý, PhD.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Roberta Černého, PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity. Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a souhlasím s tím, aby byla řádně vedena v evidence vypůjčovatelů.

V Praze dne 15.8. 2013 .....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Robertu Černému, PhD., který mě během mého studia trpělivě vedl, poskytoval mi cenné připomínky, věřil v mé vědecké schopnosti a za motivaci věnovat se vědění. Také bych chtěl poděkovat všem kolegům (současným i bývalým) z Laboratoře pro stadium kraniofaciální evoluce a vývoje za poskytnutí fotografií, zaučení v práci s grafickými programy a dobré rady. V neposlední řadě patří velký dík mým rodičům, kteří mi svou bezmeznou podporou umožňují studovat a také všem mým blízkým.

Abstrakt

Pro vývoj obratlovčího těla a hlavně hlavy obratlovců je zásadní role extenzivně migrující populace buněk tzv. neurální lišty, která přispívá do obrovského množství tkání a mimo jiné vytváří většinu hlavového skeletu, respektive kraniofaciální části lebky. Migrace hlavové neurální lišty je napříč obratlovci považována za velice konzervativní a definuje jí antero-posteriorní posloupnost třech proudů: trigeminálního, hyoidního a branchiálního. V této diplomové práci se zabývám migrací neurální lišty u bichira senegalského *(Polypterus senegalus*) a jesetera malého *(Acipenser ruthenus*), kteří reprezentují zástupce dvou bazálních linií paprskoploutvých ryb (Actinopterygii). U obou druhů jsem kombinací několika technik vymapoval hlavovou neurální lištu od jejího vzniku během neurulace až po pozdní migrační fáze a podařilo se mi identifikovat některé rozdílné skutečnosti oproti klasickému migračnímu schematu buněk neurální lišty. U bichira byla odhalena výrazná heterochronie v migraci zejména hyoidního proudu, který vzniká první a je vůbec nejmasivnější, což zřejmě úzce souvisí s raným vznikem základů vnějších žaber bichira, které se nacházejí právě na hyoidním oblouku. Jeseter naproti tomu vyjevuje klasické migratorní schema buněk neurální lišty, ale embryogeneze a raná morfogeneze jeho tkání je zásadně ovlivněna množstvím žloutku, pozicí embrya v rámci žloutkové koule, a také mezenchymatickým stavem hlavového mezodermu, takže migrace buněk neurální lišty je planární a proudy jejích buněk jsou objemné. Nalezené patrnosti buněk neurální lišty jsou diskutovány v rámci znalostí o ostatních obratlovcích a v kontextu jejich embryogeneze.

Klíčová slova: embryogeneze, migrace, neurální lišta, kraniofaciální diverzita, paprskoploutvé ryby, bichir, jeseter, evoluce.

Abstract

Extensively migrating population of neural crest cells, which contributes to many tissues and builds up most of craniofacial vertebrate structures, has a crucial role in embryonic development of vertebrate body. The migratory pathways of neural crest cells are thought to be very conserved throughout the vertebrates and cranial neural crest migration is defined by progression of three migratory streams: trigeminal, hyoid and a common branchial stream. In this diploma thesis, migration of cranial neural crest was analysed using embryos of the Senegal bichir (*Polypterus senegalus*) and of sterlet (*Acipenser ruthenus*), which represent two basal-most lineages of extant ray-finned fishes. A combination of several techniques was used in both species in order to study cranial neural crest cells from their sites of origin to post-migratory stages and the pattern of migration was compared and discussed in revealed embryonic context. In the Senegal bichir the hyoid neural crest stream was shown to migrate first and it is also the most abundant; this heterochrony shift is apparently related to formation of external gills, which in bichir are situated on the hyoid arch only. In sterlet, neural crest cells migrate in a classic pattern of three progressive streams but their dynamics and patterning is influenced by prominent yolk tissues and also by a mesenchymatic state of cranial mesoderm. These findings are discussed in a context of our knowledge from other vertebrates as well as in a framework of embryonic and morphogenetic dynamics of different species.

Key words: neural crest, migration, craniofacial diversity, bichir, starlet, ray-finned fishes, evolution

Obsah

1. Obsah 6
2. Přehled dosavadních poznatků 8
2.1. Ektoderm 8
2.2. Entoderm 8
2.3. Mezoderm 9
2.4. Neurální lišta 10
2.4.1. Historie 10
2.4.2. Evoluce 11
2.4.3. Embryonální vznik 12
2.4.4. Migrace 14
2.4.5. Deriváty buněk neurální lišty 17
2.5.Hlavová neurální lišta a skupina ryb paprskoploutvých (Actinopterygii) 18
2.6. Časoprostorové změny vývojových událostí v evoluci 20
3. Metodika 23
3.1. Embryonální material 23
3.2. Extirpace 24
3.3. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) 24
3.4. Histologická analýza 25
3.5. Imunohistochemie 25
3.5.1. Whole-mount barvení (značení na celém embryu) 25
3.5.2. Značení pomocí protilátek na řezech 26
3.6. Injikace lipofilní barvy DiI 27
3.7. Elektroporace 27
3.8. Značení pomocí CCFSE (Carboxyfluorescein) 27
3.9. WISH (Whole-mount *in situ* hybridizace) 27
3.10. Obrazová analýza 28
4. Seznam použitých zkratek 29
5. Výsledky 31
5.1. Bichir senegalský (*Polypterus senegalus*) 31
5.1.1. Vnější morfologie (SEM) 31

5.1.2. Extirpace povrchového ektodermu a analýza pomocí SEM 32
5.1.3. Histologická analýza (JB-4 pryskyřice) 33
5.1.4. Imunohistochemie 35
5.1.5. Vitální barvení lipofilním markerem DiI 37
5.1.6. *In situ* hybridizace 38
5.2. Jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) 56
5.2.1. Vnější morfologie (SEM) 56
5.2.2. Extirpace povrchového ektodermu a analýza pomocí SEM 57
5.2.3. Histologická analýza (JB-4 pryskyřice) 58
5.2.4. Imunohistochemie 59
5.2.5. Vitální barvení lipofilním markerem DiI 60
6. Diskuze 72
6.1. Migrace hlavové neurální lišty u dvou nejbazálnějších zástupců paprskoploutvých ryb 72
6.1.1. Vznik hlavové neurální lišty u bichira a jesetera 73
6.1.2. Heterochronie v emigraci hyoidního proudu hlavové neurální lišty bichira senegalského 74
6.1.3. Migrační patrnost hlav. neurální lišty u bichira a jesetera 75
6.1.4. Trigeminální proud hlav. neurální lišty u bichira a jesetera 77
7. Závěr 79
8. Seznam použité literatury 81

2. Přehled dosavadních poznatků

Cílem této kapitoly je seznámit čtenáře s přehledem dosavadních poznatků o jednotlivých zárodečných listech, které se podílejí na útváření hlavy obratlovců, s důrazem na neurální lištu a také uvést čtenáře do problematiky heterochronií a heterotopií. Neurální lišta je společně s epidermálními plakody považována za jednu z nejdůležitějších synapomorfií obratlovců, která mimo jiné umožnila obratlovcům přejít v evoluci od pasivní filtrace k aktivní predaci (srovnej. kupř. evoluci čelistí) (Gans & Northcutt, 1983).

2.1. Ektoderm

Ektoderm s entodermem jsou označovány jako primární zárodečné listy; vznikly jako první v evoluci živočichů a v embryogenezi jsou také jako první rozlišitelné (kupř. Hall, 2009). Ektoderm tvoří vnější vrstvu embrya a vzniká z něj epidermis či centrální a periferní nervová soustava (Kardong, 2009). Ektoderm je také místem vzniku epidermálních smyslových plakod, které vznikají jako destičkovité ztluštěniny v přesně lokalizované oblasti (kupř. Schlosser, 2010). Z plakod vznikají mimo jiné senzorická ganglia, olfaktorický epitel, systém postranní čáry, senzorické buňky vnitřního ucha, oční čočky, orgány chuti a elektrorecepce (Schlosser, 2010; Pieper *et* al., 2011). Nutno dodat, že ektoderm není jediným faktorem rozhodujícím o vývoji epidermálních plakod. Na indukci tvorby epibranchiální plakody se například výrazně podílí entoderm (Begbie *et* al., 1999). Tato informace je důležitá pro chápání celého vývoje, jelikož je zde dobře vidět, že většina vývojových procesů je založena na indukčních interakcích mezi několika “hráči”, které jsou naprosto nezbytné pro správný vývoj jedince. (Hall, 2003)

2.2. Entoderm

Entoderm vzniká během embryonálního procesu gastrulace, což je embryonální děj, při kterém se vytváří zárodečné vrstvy a vzniká prvostřevo (archenteron). Z entodermu vzniká farynx, trávicí žlázy (jako játra a slinivka břišní), u bezčelistnatých obratlovců (Agnatha) entoderm také vytváří epitel vnitřních žaber a

u čtyřnožců (Tetrapoda) z entodermu vznikají plíce (shrnuto např.. Kardong; 2009). Z faryngu se během dalšího vývoje formují faryngeální oblouky. Z druhého faryngeálního oblouku vzniká štítná žláza (glandula thyroidea), z třetího brzlík (thymus) a ze čtvrtého příštitná tělíska (glandulae parathyroideade) (Kardong, 2009), nicméně brzlík byl v evoluční historii přítomen na každém faryngeálním oblouku a až u rodu Homo je lokalizován pouze na třetím oblouku (kupř. Slípka, 1986). Faryngeální entoderm je také nezbytný pro indukci kraniofaciálních chrupavek vznikajících z prvního žaberního oblouku a kupříkladu na kuřeti bylo ukázáno, že signály emanující z entodermu přímo rozhodují o velikosti a orientaci jednotlivých elementů (kupříkladu Couly *et* al., 2002).

2.3. Mezoderm

Mezodermální zárodečný list vzniká během gastrulace díky interakcím mezi primárními zárodečnými listy (tedy ektodermem a entodermem) a je tedy označován jako sekundární zárodečný list (Hall, 2009). Mezoderm se diferencuje do několika subpopulací: postupně vzniká chordamezoderm, zdroj chordy, paraxiální mezoderm, z něhož vzniká většina svalstva, mezoderm laterální destičky utvářející kosterní aparát končetin, srdce a vaskulární systém a také mezodermální subpopulace, ze které vzniká urogenitální soustava (Kardong, 2009).

Paraxiální mezoderm je v trupu tvořen somity. První somit se objevuje za otickou kapsulí a každý somit se diferencuje do třech částí: sklerotom, myotom a dermatom. Ze sklerotomu vznikají obratle a žebra, z myotomů se utváří svalovina trupu, z dermatomu vznikají svaly končetin (kupř. Gilbert, 2010). V preotické hlavové oblasti je paraxiální mezoderm nesegmentovaný a nejsou zde známy elementy či jasně segmentované populace, jako je tomu v trupu v případě somitů. U několika obratlovců byly nicméně popsány tzv. somitomery (kupř. Jacobson, 1988), které sice byly přirovnávány k trupovým somitům, leč jakkoliv byla jejich existence v minulosti diskutována, dnes není obecně akceptována (kupř. Freund *et* al., 1996; Kuratani *et* al., 1999).

2.4. Neurální lišta

2.4.1. Historie

Neurální lištu objevil švýcarský anatom a fyziolog Wilhelm His, jenž tuto buněčnou populaci pojmenoval v roce 1868 Zwischenstrang (volný překlad: “pruh tkáně mezi vrstvami”). Identifikoval ji na kuřecím embryu mezi vyvíjející se neurální trubicí a povrchovým ektodermem (His 1868, 1879; dle Hall, 2009). Termín neurální lišta (angl. Neural crest) použil poprvé anglický zoolog Arthur M. Marshall v roce 1874 (Hall, 2009). V té době, tzn. v druhé polovině 19. století, vládlo v embryologii dogma či tzv. teorie zárodečných vrstev (Germ-layer theory). Ústřední myšlenkou této představy je, že všechny tkáně, resp. buněčné typy, jsou odvozeny od třech zárodečných listů a že konkrétní typy tkání povstávají vždy z konkrétních a jasně daných vrstev. Podle této teorie, obecně řečeno, z ektodermu vznikají vnější tkáně, z entodermu tkáně vnitřní a z mezodermu vznikají všechny kosti, pojivová tkáň, svalstvo a krevní buňky, tedy jakési tkáně vmezeřené či “prostřední”. Objevem neurální lišty byla podlomena do té doby převládající jednoduchost teorie zárodečných vrstev, neboť buňky neurální lišty, odvozené vlastně z ektodermu, viz níže, dávají vznik mnoha tkáním, jejichž invazivita jim umožňuje osídlit kterýkoliv prostor obratlovčího těla.

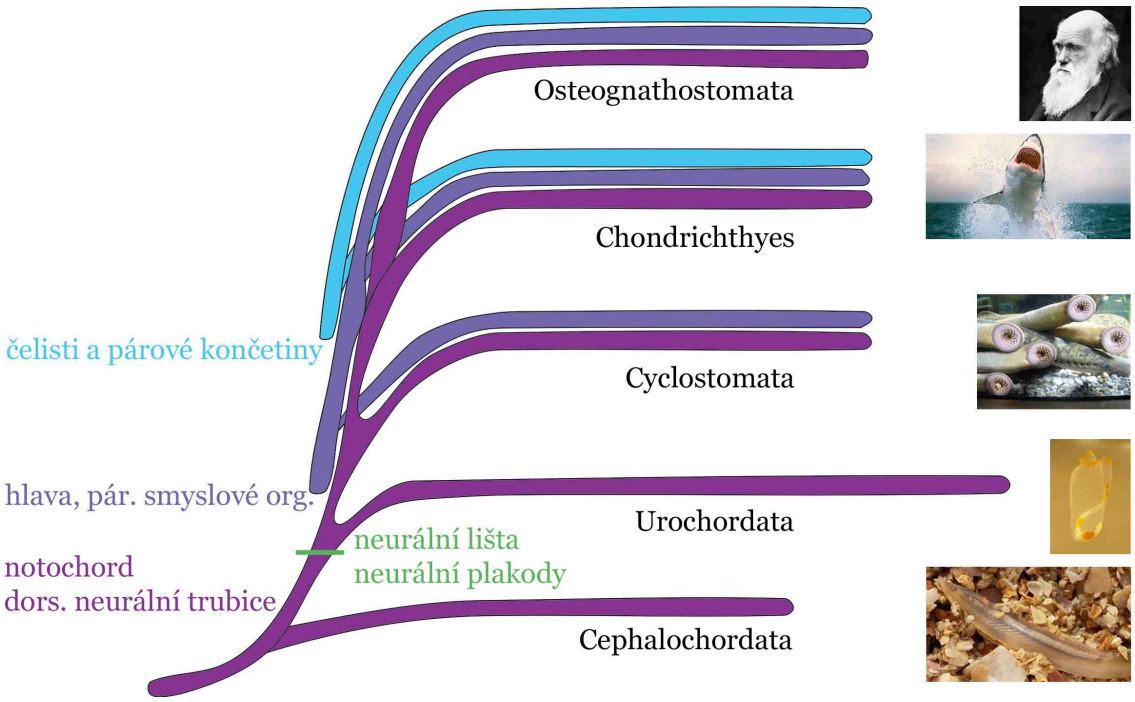
První kdo přišel s důkazem, který byl jasně v rozporu s teorií zárodečných vrstev, byla americká embryoložka Julia B. Platt (Platt, 1893), která detailně popsala příspěvek neurální lišty do čelistního a branchiálního aparátu u severoamerického mloka rodu *Necturus*. Tento objev byl však většinou tehdejších vědců odmítnut a upadl v zapomnění. Až po více než 30 letech potvrdili svými experimenty kupříkladu Landacre (Landacre, 1921) či Stone (Stone, 1922) zásadní přínos Julie B. Platt k poznání embryogeneze hlavy. Hörstadius a Sellman (Hörstadius & Sellman, 1946) za pomoci experimentálního vyštěpení (tedy tzv. extirpací) různých částí neurálních valů axolotla vytvořili první “mapu” neuruly ukazující příspěvek jednotlivých proudů buněk neurální lišty a jejich podíl na vývoji hlavy v anterio-posteriorním uspořádání a tedy dokázali, že vývoj neurální lišty je regionalizován. Pro zjednodušení lze říci, že nejvíce anteriorní část neurální lišty dává vznik elementům prvního, mandibulárního oblouku. Elementy hyoidního

oblouku jsou vytvářeny z populace neurální lišty ležící posteriorněji od mandibulární populace, zatímco z nejvíce posteriorní části hlavové neurální lišty vznikají skeletální elementy branchiálních oblouků. Modernější studie migrace neurální lišty přinesly další potvrzení těchto dat za použití radioaktivní značky (H-thymidinu), např. u kuřete (Johnston, 1966), či na obojživelnících (Chibon, 1967; dle Hall, 1999). Zásadním mezníkem pro pochopení biologie a migrace neurální lišty byla metodika francouzské bioložky Nicole Le Douarin (Le Douarin, 1971; dle Hall, 1999), která využívá mezidruhových transplantací a tvorbu chimér; v tomto případě kuře a křepelku). Díky mezidruhovým transplantacím bylo umožněno sledovat osud buněk neurální lišty na histologické úrovni a tyto později posloužily k tvorbě imunologického markeru na značení neurální lišty(Le Douarin, 1974). V současné době se ke sledování buněk neurální lišty nejčastěji používá buď metoda genové exprese – tedy topografická analýza exprese genů, které jsou v této subpopulaci aktivní (kupř. Meulemans & Bronner-Fraser, 2004), či tzv "fate-mapping" přístupy, kdy je nějaký buněčný marker (DiI, DiO) injikován do maternální populace neurální lišty, tato se označí, což umožňuje sledovat její následnou migraci (kupř. Serbedzija *et* al., 1989; Lumsden *et* al., 1991).

2.4.2. Evoluce

Neurální lišta je společně s neurálními plakodami považována za jednu z nejdůležitějších synapomorfií nás obratlovců (Gans & Northcutt, 1985; Gans 1987; Schlosser 2010). Recentní fylogenetická analýza strunatců ukazuje, že pláštěnci (Urochordata) tvoří sesterskou skupinou obratlovců (Vertebrata), zatímco bezlebeční (Cephalochordata) tvoří bazální linii v rámci strunatců (Chordata) (Delsuc *et* al., 2006) (Obr. 1). Blízký příbuzenský vztah pláštěnců a obratlovců podporuje i recentní objev buněčné linie povahy neurální lišty (neural crest-like) u sumek (Abitua *et* al., 2013), zatímco u kopinatce zatím žádné embryonální populace či struktury i přes intenzivní snahy stále nalezeny nebyly. Pokud by tedy buněčná populace objevená u sumek byla skutečně homologická neurální liště, znamenalo by to, že neurální lišta je spíše synapomorfií skupiny Olfactores (skupina tvořená obratlovci a pláštěnci), než synapomorfií obratlovců. Ve studii, ve které byla identifikována buněčná linie povahy neurální lišty u sumek, autoři

navrhují hypotézu, že buňky neurální lišty vznikly koopcí (zavzetím) jednoho či více mezenchymálních determinantů (např. genu *Twist*) do "prapůvodních" (rudimentárních) buněk neurální lišty. To by znamenalo, že buňky neurální lišty nevznikly u obratlovců, ale že vznikly modifikací vývojové signalizační sítě strunatců (Abitua *et* al., 2013).



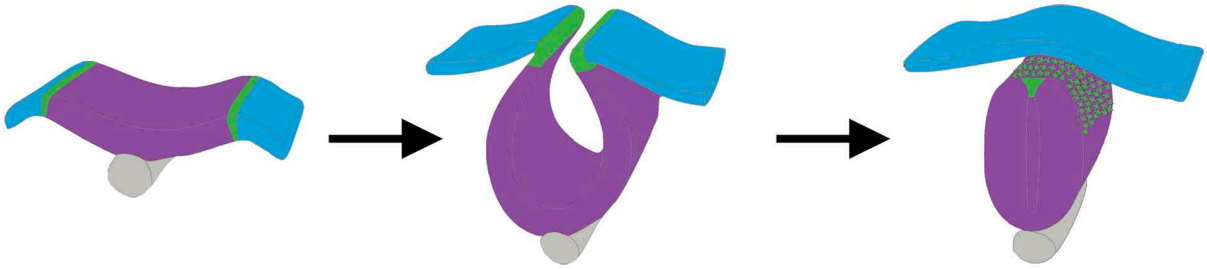
Obrázek 1: Fylogenetický strom strunatců s vyznačeným počátkem výskytu neurální lišty a neurálních plakod

2.4.3. Embryonální vznik

Buňky neurální lišty vznikají během neurulace, což je embryonální proces, kdy se na dorzální straně embrya utváří neurální trubice. Buňky neurální lišty vznikají na hranici neurálního a non-neurálního (epidermálního) ektodermu, v místě, kde se později utvářejí tzv. neurální valy (kupř. Hall & Hörstadius, 1988). Vznik buněk neurální lišty je indukován interakcemi mezi neurálním ektodermem, epidermálním ektodermem a také i paraxiálním mezoderem (Dickinson *et* al., 1995; Basch et al., 2004). Indukce vzniku neurální lišty je založena na kombinaci několika základních signálních faktorů, jako jsou BMP, FGF, RA, či tzv. Wnt proteiny (LaBonne &

Bronner-Fraser, 1998; Aybar & Mayor, 2002; Wu *et* al, 2003; shrnuto kupř. v Basch & Bronner-Fraser, 2006).

Po indukci buněk neurální lišty dochází k tzv. epitelo-mezenchymální tranzici či přechodu (EMT). V průběhu EMT ztrácejí buňky postupně adhezi k povrchu a k sousedním buňkám, mění svou morfologii a migrují z povrchu neurálních valů (Duband *et* al., 1995; Theveneau & Mayor, 2012).



Obrázek 2: Schema neurulace (vznik neurální trubice invaginací); fialová značí neurální ektoderm, modrá značí ne-neurální ektoderm; zelená značí oblast z které vzniknou buňky neurální lišty; Upraveno z Donoghue *et* al., 2008

Jak již bylo řečeno, ke vzniku neurální lišty dochází při utváření neurální embryonální trubice. V tomto vývojovém momentu dochází k tvorbě neurálních valů na rozhraních mezi neurální ploténkou a epidermálním ektodermem, které se postupně zvedají dorzálním směrem, později splývají a utvářejí uzavřenou trubici (Obr. 2). U většiny obratlovců dochází ke vzniku buněk neurální lišty až po úplném uzavření neurální trubice, jak je vidět kupř. u ptáků (Tosney, 1982; Noden, 1988; Tokita, 2006), plazů (Kundrát, 2009), některých obojživelníků (Jacobson & Meier, 1984; Falck *et* al., 2002; Mitgutsch *et* al., 2008), bahníka (Falck *et* al., 2000; Ericsson *et* al., 2008) a mihulí (Horigome *et* al., 1999). Nicméně už i v takto raném stadiu existují vzájemné časové posuny, tedy tzv. heterochronie, díky kterým může docházet k odmigrování buněk neurální lišty ještě před úplným uzavřením neurální trubice, jak je známo u některých obojživelníků (skokan japonský: Ichikawa, 1937; drápatka: Sadaghiani & Thiébaud, 1987; bezblanka: Moury & Hanken, 1995; kuňka východní: Olsson & Hanken, 1996; vakorosnička: del Pino & Medina, 1998; skokan hnědý: Mitgutsch *et* al., 2008), či savců (Tan & Morris-Kay 1985, 1986). U australské vačice *Monodelphis domestica* buňky neurální lišty odmigrovávají dokonce již z úrovně nediferencované neurální ploténky, tedy mnohem dříve, než-li

dochází k vlastní neurulaci (Smith, 2001).

2.4.4. Migrace

Většina vývojových procesů v těle obratlovců probíhá v anterio-posteriorním sledu a ne jinak je tomu u vzniku, resp. migrace buněk neurální lišty. Buňky neurální lišty vznikají po celé délce neurální trubice a tak rozlišujeme neurální lištu - hlavovou, vagální (krční) a trupovou (kupř. Le Douarin & Kalcheim, 1999). Po prodělání výše zmíněného epitelo-mezenchymálního přechodu migrují buňky hlavové neurální lšity z oblasti budoucího mozku ventrolaterálním směrem, ponejvíce mezi vrstvou mezodermu a povrchovým ektodermem, nicméně velmi malá část buněk neurální lišty může migrovat skrz paraxiální mezoderm (Noden, 1988; Serbedzija *et* al., 1992). Trupová neurální lišta migruje dvěma hlavními směry: ventrolaterálním směrem pod povrchovým ektodermem a ventrální cestou skrze somity (ventromediání cesta (Rickman *et* al., 1985; Le Douarin & Kalcheim, 1999). Buňky trupové neurální lišty migrující skrze somity migrují pouze první polovinou somitů, tzn. že migrace je striktně segmentální a z této subpopulace trupové neurální lišty vznikají senzorická ganglia a Schwanovy buňky. Subpopulace trupové neurální lišty migrující ventrolaterální směrem migruje naproti tomu nesegmentálně a vznikají z ní především melanocyty (kupř. v Bronner-Fraser, 1994; Krull, 2001). V migraci trupové neurální lišty však nemůžeme rozlišit migrační proudy tak, jako je tomu v hlavě, protože buňky trupové neurální lišty migrují zásadně jednotlivě.

V hlavové oblasti je obecně migrační patrnost (pattern) buněk neurální lišty definován třemi migračními proudy, které vznikají separátně z jednotlivých částí neurální trubice a nazývají se trigeminální (nebo též mandibulární), hyoidní a branchiální (neboli postotický) (kupř. Kuratani *et* al., 1999). Trigeminální proud vzniká z přední části neurální trubice (prosencephala, mesencephala a dvou rhombomer (r1 a r2) rhombecephala) a v pozdější fázi migrace vytváří tři větve obklopující optickou plakodu (primordium oka) a osidluje celou anteriorní část hlavy (Kuratani *et* al., 1999; Cerny *et* al., 2004). Z nejvíce rostrální oblasti prosencephala odmigrovává jen velmi malé množství buněk (kupř. Kuratani *et* al., 1999), což má zřejmě souvisloust s planplakodální oblastí (Pieper *et* al., 2011), jelikož v této oblasti vzniká velké množství plakod využívající tento prostor. Hlavní část

trigeminálního proudu emigruje z mesencephala, a prvních dvou rhombomer rhombencephala. K těmto buňkám ještě přispívá část buněk vznikající z rhombomery 3 (r3) (Lumsden *et* al., 1991; Sechrist *et* al., 1993; Schilling & Kimmel, 1994; Kulesa *et* al., 2004). Jak uvádí japonský biolog Shigeru Kuratani (2005), je to právě trigeminální proud a jeho buňky, které konstituují celou přední část lebky a tedy i tzv. kraniofaciální oblast ("obličej"), tedy tu asi nejvíce fenotypově variabilní část. Tento migrační proud je u všech obratlovců klasicky považován za největší (srovnej ale kapitola Výsledky bichir). Dalším proudem je hyoidní proud, který vzniká v rhombomeře 4 (r4) a bývá obecně ze všech tří proudů nejmenším (srovnej kapitola Výsledky bichir). Buňky hyoidní proudu společně s malým příspěvkem buněk z r3 a r5 přispívají k tvorbě druhého branchiálního oblouku (Lumsden *et* al., 199; Schilling & Kimmel, 1994; Kulesa *et* al., 2004). Posledním migračním proudem je proud branchiální, vznikající z rhombomer 6 a 7, který s malým příspěvkem buněk z r5 tvoří mezenchym vyplňující branchiální oblouky (Lumsden *et* al., 1991; Schilling & Kimmel, 1994).

Jednotlivé proudy buněk neurální lišty jsou od sebe navzájem odděleny dvěma rhombomerami (r3 a r5), které vytvářejí tzv. „neural crest-free zone" (Serbedzija *et* al., 1992; Sechrist *et* al., 1993; Birgbauer *et* al., 1995; Kulesa & Fraser, 1998). Z těchto oblastí buňky nemigrují laterálně, ale velká většina buněk zde vzniklých prodělává apoptózu (Graham *et* al., 1993; Graham *et* al., 1994). Buňky, které apoptóze uniknou migrují anteriorně či posteriorně a přispívají tak k sousedním proudům (Sechrist *et* al., 1993; Birgbauer *et* al., 1995; Graham *et* al., 2004). Oba tyto segmenty rhombencephala jsou definovány expresí genu *krox20* (Nieto *et* al., 1992), cehož se využívá při určení přesné lokace rhombomer 3 a5 (Bradley *et* al, 1993; Nieto *et* al., 1995).

V hlavové oblasti se nacházejí bariéry, které svou přítomností ovlivňují migraci jednotlivých proudů neurální lišty a podílejí se tak na jejich sekundární separaci, jako jsou např. faryngeální výchlipky, oční primordium, či otická kapsule (Kuratani *et* al., 1997; Cerny *et* al., 2004). Otická kapsule se vyvíjí na hranici rhombomer 4 a 5, což umožňuje buňkám neurální lišty migrovat z rhombomery 5, která je popisována jako neural crest-free zone, ale zároveň brání migraci z rhombomery 4. V další fázi vývoje se otická kapsule přesouvá do oblasti rhombomery 5 a buňkám neurální lišty tak brání v další migraci z této oblasti a

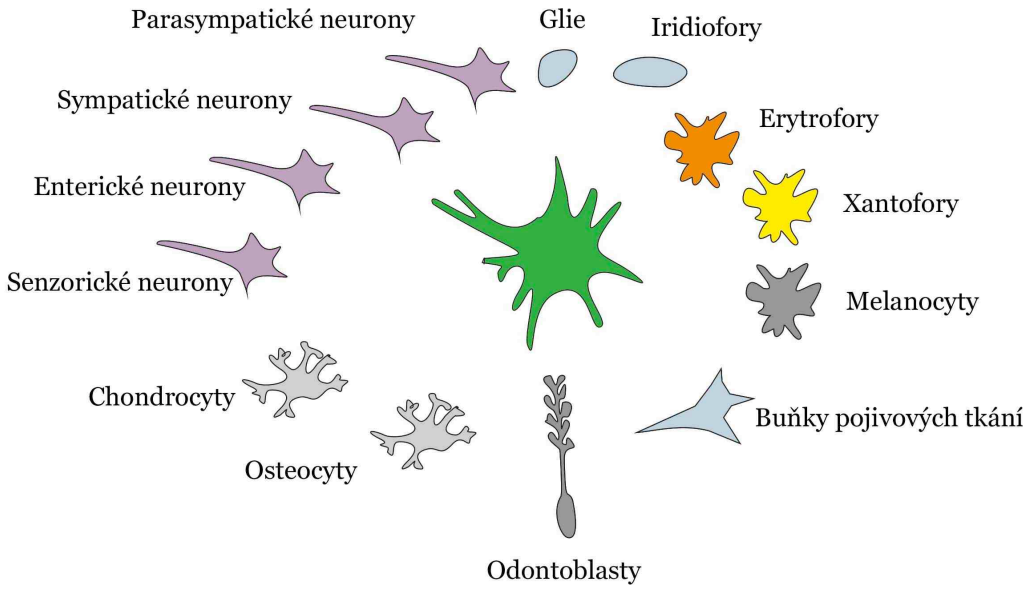
buňky z rhombomery 4 mohou emigrovat. Ve finální pozici otická kapsule brání migraci buněk neurální lišty z rhombomery 5 a 6, nicméně tato situace byla popsána u mihule (Kuratani & Horigome, 2000). Faryngeální výchlipky utvářejí migrační koridor pro buňky neurální lišty tím, že kanalizují migrující buňky pouze do přesně definované migrační cesty a také pomáhají k rozlišení separátních proudů hlavové neurální lišty (např. Kuratani *et* al., 1999).

Buňky hlavové neurální lišty jsou během migrace velmi plastické a dokáží reagovat na změny ve svém okolí. Pokud je například experimentálně vůdčí část migračního proudu neurální lišty vystavena mechanické překážce, dokáže zareagovat, obejít ji a domigrovat do finální lokality (srovnje kupř. Kulesa *et* al., 2005). Během svého putování dokáží buňky neurální lišty také velmi rychle osídlit místa, kde byla snížena jejich početnost kupř. experimentální extirpací včetně migrace sousedních oblastí, kde normálně nemigrují (Saldivar *et* al., 1997; Kulesa *et* al., 2000; Creuzet *et* al., 2004). Lze tedy říci, že přestože migrační partnost buněk neurální lišty je obecně poměrně rigidně nastavena ve smyslu rozdělení na tři hlavní proudy, v případě potřeby může být migrace modulována dle potřeby, což ukazuje na obrovskou plasticitu buněk neurální lišty.

Neurální lišta je často srovnávána s rakovinnými buňkami, jelikož sdílejí stejnou schopnost invazivity do jiných tkání (sdílejí stejnou expresi genů, kupř. Snail, Twist – Tucker, 2004; Kang & Massagué, 2004; Micalizzi *et* al., 2010). Spojitost s tak “populárním” tématem jakou je rakovina, přináší obrovskou pozornost vědecké obce a získaná data o rakovině, tak mohou být komparativně využívána pro výzkum samotné neurální lišty. Velká pozoronost je věnována především studiu mechanismů epitelo-mezenchymálního přechodu a migrace. Tento „navigační systém“ je velmi komplexním mechanismem (podrobně v Kulesa *et* al., 2010), na kterém se podílí chemoatrakce (Kubota & Ito, 2000), mezibuněčný kontakt (Kulesa & Fraser, 1998; Carmona-Fontaine *et* al., 2008) a v neposlední řadě kontakt buněk s okolním prostředím, resp. adheze buněk k podkladu (Bronner-Fraser, 1993).

2.4.5. Deriváty buněk neurální lišty

Neurální lišta má dvě klíčové vlastnosti: schopnost extenzivně migrovat (viz výše) a vytvářet obrovské množství buněčných derivátů (Donoghue *et* al., 2008). Po svém vzniku z neurální trubice buňky neurální lišty migrují ventrálním směrem skrze embryo a vytváří celou škálu derivátů. Neurální lišta poskytla v průběhu evoluce obratlovcům několik nových buněčných typů, např. senzorické neurony, gliové buňky, xantofory, buňky vytvářející povázky svalů, odontoblasty, osteocyty a celou řadu dalších (Obr. 3) (Le Douarin & Kalcheim, 1999; Le Douarin *et* al., 2004). Analýza počtů buněčných typů odvozených z jednotlivých zárodečných listů ukázala, že neurální lišta vytváří výrazně větší počet buněčných derivátů než mezoderm (Vickaryous & Hall, 2006). Díky svému obrovskému vývojovému potenciálu a široké škále nových buněčných typů je neurální lišta považována za čtvrtou zárodečnou vsrtvu a obratlovci někdy bývají označováni za tetrablastickou skupinu, tedy skupinu, která má čtyři zárodečné listy (Hall, 1997, 2009).



Obrázek 3: Schema znázorňující typy buněčných derivázů vznikajících z neurální lišty; Upraveno z Donoghue *et* al., 2008

2.5. Hlavová neurální lišta a skupina ryb paprskoploutvých (Actinopterygii)

Skupina paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) má největší diverzitu v rámci obratlovců (cca 28 tisíc druhů z celkového počtu asi 55 tisíc obratlovců; Nelson, 2006) a díky obrovskému potenciálu modifikovat skeletální tkáně (srovnej kupř. schopnost vytvářet diverzifikované čelistní aparáty, viz kupříkladu studie na východoafrických cichlidách: Roberts *et* al., 2011) představuje vynikající skupinu pro studium kraniofaciální diverzity.

První detailní studie popisující migraci hlavové neurální lišty u paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) sepsal Langille a Hall u druhu *Oryzias latipes* (Langille & Hall, 1987, 1988). Autoři této prací mimo jiné ukázali, že chondrogenní potenciál (tedy schopnost diferenciovat se v chrupavku) mají buňky neurální lišty migrující v oblasti mesencephala a rhombencephala, ne však ty z prosencephala. Autoři se však nijak konkrétně nevyjadřují k tomu, co by toto omezení chondrogenní potence mohlo pro vývoj tohoto druhu znamenat. Další podrobná práce zabývající se migrací neurální lišty byla zaměřena na druhy *Xiphophorus maculatus* a *X. helleri* (Sadaghiani & Vielkind, 1989). I v této práci byly identifikovány jisté rozdíly v migraci oproti ostatním studovaným obratlovcům: zdá se, že se zde neutvářejí separátní migrační proudy, ale migrace buněk neurální lišty je celistvá (Sadaghiani & Vielkind, 1989).

Jedním z nejčastěji využívaných modelových druhů v dnešní vývojové biologii, a to dokonce pro studium kraniofaciální morfogeneze, je zebřička, nebo-li danio pruhované (*Danio rerio*). Obrovskou výhodou tohoto rybího modelového druhu je mimo jiné průhlednost embryí během vývoje a tedy vynikající možnost optických analýz ontogeneze (srovnej Metscher & Ahlberg, 1999). Pro studium migrační patrnosti neurální lišty však tento druh není příliš vhodný kvůli malé velikosti vajíček (Obr. 5).

Zebřička jako většina zástupců kostnatých ryb prodělává sekundární neurulaci, kdy se utváří tzv. neurální kýl a neurální trubice vzniká kavitací a ne invaginací jako je tomu u “klasické” primární neurulace (Papan & Campos-Ortega, 1994; Lowery & Sive, 2004). Buňky neurální lišty v průběhu sekundární neurulace vznikají delaminací z dorzální strany neurálního kýlu a akumulují se nad neurální

trubicí před tím, než začnou migrovat (Papan & Campos-Ortega, 1994; Hall, 2009). U zebřičky však velké množství buněk hlavové neurální lišty nevzniká z dorzální strany strany neurálního kýlu, ale odmigrovává laterálně a vytváří předmigrační masu buněk neurální lišty (Schilling & Kimmel, 1994). Tyto předmigrační buňky jsou však segmentovány stejným způsobem do separátních proudů, jako je tomu u živočichů s klasickou neurulací. Celá předmigrační populace buněk neurální lišty může být také rozdělena v medio-laterální ose na subpopulace poskytující různé typy derivátů. Z nejvíce laterální subpopulace vznikají neurony, z nejvíce mediální subpopulace vznikají chondrocyty a buňky pojivových tkání a z prostřední subpopulace vznikají Schwanovy a pigmentové buňky (Schilling & Kimmel, 1994). Nicméně velká většina studií je zaměřena na různé jednotlivosti spojené s neurální lištou, ale komplexním vyjevením migrace hlavové neurální lišty se nikdo detailně nezabýval. Existují pouze studie zabývající se migrací trupové neurální lišty využívající extirpací a DiI injikací (Eisen & Weston, 1993; Raible & Eisen, 1994).

Všechny výše uvedené druhy navíc patří do skupiny kostnatých ryb (Teleostei) a studie na bazálních řádech jako jsou mnohoploutví (Polypteriformes) a jeseteři (Acipenseriformes) neexistují. Jedinou výjimkou je práce na veslonosovi druhu *Polyodon spathula*, která okrajově popisuje migraci neurální lišty pomocí SEM (Bemis & Grande, 1992; Bemis *et* al., 2005). Proto jsem se rozhodl zaměřit svou pozornost na migraci neurální lišty u druhu *Polypterus senegalus* (bichir senegalský; Polypteriformes) a *Acipenser ruthenus* (jeseter malý; Acipenseriformes), neboť oba tyto druhy jsou zajímavé jednak svým fylogenetickým postavením a také svou morfologií.

Řád mnohoploutví (Polypteriformes) je tvořen dvěma rody, *Polypterus* (Saint-Hilaire, 1802) čítající 14 druhů a *Erpetoichthys* (Smith, 1865) s jedním druhem (Daget *et* al., 2001). Řád Polypteriformes se nachází velmi blízko evolučního bodu, kdy došlo k oddělení paprskoploutvých (Actinopterygii) a násadcoploutvých (Sarcopterygii) obratlovců, a bichir je tedy považován za reprezentanta evolučně "primitivních" ryb.

Řád jeseteři (Acipenseriformes) patří do nadřádu Chondrostei (chrupavčití) a je tvořen dvěma čeleděmi, Acipenseridae (jeseterovití) a Polyodontidae (veslonosovití). Acipenseridae zahrnují 25 druhů a Polyodontidae dva rody, *Polyodon* (veslonos) a *Psephurus* (lopatonos) (Nelson, 2006). Celý řád evolučně

vznikl zřejmě z některé skupiny tzv. paleonisků (Grande & Bemis, 1991) a má velmi charakteristickou morfologii se zploštělým rostrem. U celé skupiny došlo k potlačení kostnatění ve vnitřním i dermálním skeletu, take došlo k redukci až vymizení chrupu a objevují se charakteristické vousky na spodině rypce před ústy (Ostaszewska & Dabrowski, 2009).

2.6. Časoprostorové změny vývojových událostí v ontogenezi

Časové a poziční změny jsou označovány jako heterochronie a heterotopie. Termín heterochronie poprvé definoval Ernst Haeckel, který ji považoval za nerovnoběžnost mezi ontogenezí a fylogenezí (dle Smith, 2001) a heterotopie považoval za součást heterochronií (dle Zelditch & Fink, 1996). Existuje několik pohledů na to, co je heterochronie a heterotopie. Jednoduše řečeno, heterochronie je nestejně rychlá evoluce různých anatomických znaků (Roček, 2002) a heterotopii je možno vidět jako poziční posun evoluce různých anatomických znaků. Tyto dvě události však mohou být navzájem spřažené během vývoje organism a tedy mohou fungovat společně (Zelditch, 2003).

Heterochronie ve spojitosti s neurální lištou byly zmiňovány především s jejich ranou emigrací, kdy se jedná především o to, zda buňky neurální lišty odmigrovávají před, či až po splynutí neurálních valů (kupř. Moury & Hanken, 1995; del Pino & Medina, 1998; Mitgutsch *et* al., 2008). Asi vůbec nejranější migrace buněk neurální lišty u obratlovců byla popsána u vačnatců, konkrétně u vačice druhu *Monodelphis domestica*, u které buňky neurální lišty začínají odmigrovávat dokonce na úrovni nediferencované neurální ploténky (Smith, 2001; Vaglia & Smith, 2003). V hlavě vačnatců se totiž přední část jejich chrupavčité lebky a především pak nasální oblasti, kosti okolo ústní dutiny a svaly hlavy se vyvíjejí velmi raně (Clark & Smith, 1993; Smith, 1994). Tato vývojová heterochronie má zjevný ekologicko-evoluční dopad, neboť nedovyvinutá mláďata vačnatů se tak mohou dostat po narození do matčina vaku k mléčné bradavce vlastními silami. Další příklad, který se zabývá heterochroniemi a neurální lištou, je vznik svalu *musculus pseudomasseter*, který se vyskytuje pouze u papoušků (Pssitaciformes). Srovnávací analýzou mezi kuřerem a papouškem bylo zjištěno, že u papouška

rodu *Nymphicus* buňky trigeminálního proudu neurální lišty migrují časněji a osidlují mnohem ventrálnější pozice. Buňky trigeminálního proudu neurální lišty tak mohou mnohem dříve osídlit první faryngeální oblouk, akumulovat se zde a dát vzniknout buňkám pojivových tkání, které pozmění svalovou architektoniku přestavbou svalového prekurzoru *musculus adductor mandibulae* (Tokita, 2006). Jak je totiž známo z prací na několika druzích obratlovců (Noden, 1986; Olsson *et* al., 2001; Ericsson *et* al., 2004) jsou buňky pojivových tkání odvozených z neurální lišty schopny přebudovávat svalovou architektoniku v hlavě, díky čemuž mohou vznikat nové svaly a tak například u papopušků mohl vzniknout přebudováním *m. adductor mandibulae* jeden ze specifických svalů pro papoušky *m. pseudomasseter*, který papouškům například umožňuje rozlousknout extrémně tvrdou potravu.

Darwinovy pěnkavy jsou ideálními modely pro studium evolučních dějů. Tyto pěnkavy rodu *Geospiza* mají důsledkem adaptivní radiance značně morfologicky diverzifikované zobáky, které umožnili se specializovat na odlišné potravní niky, a pomohly tak zamezit vzájemné konkurenci o potravu. Určitý pohled na vývojový mechanismus, který se podílí na tvorbě tvarové rozmanitosti zobáků u Darwinových pěnkav, přinášejí dnes již klasické práce Abzhanova *et* al. (2004; 2006), které pojednávají o tom, že za šířku zobáků je zodpovědná exprese genu *Bmp4* ve faciálním ektodermu (Abzhanov *et* al., 2004) a za vývoj dlouhých zobáků odpovídá exprese genu CaM také ve faciálním ektodermu (Abzhanov *et* al., 2006). Na expresi těchto genů je možné se dívat z pohledu heterochronického a heterotopického působení, poněvadž např. při delší a prostorově širší expresi genu *Bmp4* se vyvíjí velmi masivní a široký zobák, zatímco u druhu majícího užší zobák není exprese genu *Bmp4* tak masivní. Funkce genů *Bmp4 a CaM* na vývoj kraniofaciální části lebky (“obličeje”) byla také potvrzena u východoafrických cichlid (Parsons & Albertson, 2009). Je třeba zmínit, že výše zmíněné práce na pěnkávách a cichlidách zmiňují pouze roli povrchového ektodermu a jeho signalizací, ale jaký podíl na tvorbě tvarové rozmanitosti v “obličejové” části hlavy má mezenchym původu neurální lišty nezmiňují.

Je dobře známo, že velká většina genů jeu většiny mnohobuněčných organizmů (Metazoa) konzervativní (extrémem jsou kupř. *Hox* geny) a fenotypovou

diverzitu neovlivňuje ani tak přítomnost či nepřítomnost “specifických” genů - jak se dříve myslelo, nýbrž rozdílná genová regulace “stejných” genů v prostoru a čase (Caroll *et* al., 2001). Tento průnik molekulární genetiky a otázek spojených s utvářením fenotypové diverzity pomocí heterochronií je dobrým pojítkem mezi mikroevolučními procesy a makroevolučními změnami (Smith, 2003). Z pohledu evoluční biologie je tedy velmi zajímavé, že i jen malá časoprostorová změna v působení konzervativního genu může způsobit obrovský posun v morfogenezi a heterochronie a heterotopie tak mohou představovat klíčové hráče fenotypové diverzity.

3. Metodika

3.1. Embryonální materiál

Embrya bichira senegalského (*Polypterus senegalus,* Cuvier, 1829) byla z části zajištěna z vlastního chovu naší Laboratoře (Katedra zoologie), většina embryonálního materiálu však pocházela ze soukromého chovu pana Vojtěcha Tichého z Kravař u Opavy. Vajíčka jesetera malého (*Acipenser ruthenus*, Linnaeus 1758) byla poskytnuta Ing. Davidem Gelou, PhD., z velkochovů Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického (JČU, Č. Budějovice) ve Vodňanech.

Odchov embryí do potřebného stáří ontogenetického vývoje byl zajištěn pomocí speciální odchovávací aparatury (viz obr. 4), která byla vymyšlena a sestrojena autorem této práce a Mgr. Martinem Minaříkem. Odchovávací aparatura byla umístěna do akvarijních chovů katedry zoologie, kvůli teplotnímu optimu pro vývoj embryí obou druhů. Při dosažení kýženého ontogenetického stadia byla embrya anestetizována v roztoku MS-222 (Serva) a poté fixována 4% PFA pufrovaným 0,1M roztokem PBS, či pro SEM fixačním roztokem dle Mitgutsch (2007) (modifikované Karnovskeho fixativum). Takto fixovaný materiál byl uskladněn při 4°C. Pro potřebu *in situ* hybridizací byla embrya nejdříve fixována ve 4% PFA a následující den postupně převedena do 100% metanolu a skladována při -20°C.

Obrázek 4: Snímek odchovávací aparatury. Foto pořídil M. Minařík

Pro potřebu určení stáří bichira byla použita ontogenetická (stádiovací) tabulka publikována v roce 2009 (Diedhiou & Bartsch, 2009). Stáří jesetera malého bylo určováno pomocí stádiovací tabulky publikované v roce 1993 (Dettlaff et al., 1993).

3.2. Extirpace

Pro extirpační operace (rozuměj operace, při kterých je odstraněna část embrya, v tomto případě povrchový ektoderm) byla embrya z fixačního roztoku promyta v 0,1M PBS. Následně byla přemístěna do Petriho misky s plastelínou, jelikož plastelína umožnila vytvořit vhodné komůrky pro jednotlivá embrya a správně je polohovat pro samotnou extirpaci mnohem lépe, než obecně používaný agarový bloček. Extirpace byly prováděny pod binokulární lupou Olympus SZX12 za pomoci speciálně broušených wolframových jehel. Ektoderm byl odstraňován z ventrální strany embrya až na dorzální stranu neurální trubice. Po odstranění požadovaného množství tkáně byly vzorky dále zpracovány SEM.

3.3. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Pro SEM byl použit materiál fixovaný v modifikovaném Karnovskeho fixativu dle Christiana Mitgutsche (Mitgutsch, 2008), nebo byl použit fixovaný materiál ve 4% PFA, který byl následně přefixován do výše zmíněného fixačního roztoku minimálně po 24 hodin. Po promytí 0,1M PBS se embrya odvodnila vzestupnou alkoholovou řadou až do 100% etanolu (časové intervaly 10-15 min podle velikosti vzorku). Pro dokonalejší odvodnění byla použitá širší škála alkoholů o různých koncentracích a ve 100% alkoholu byla embrya promyta dvakrát pro dosažení lepší dehydratace. Alkoholové roztoky byly rozředěny v PBS, což se ukázalo jako lepší než varianta ředění v destilované vodě, jelikož nedocházelo k morfologickým defektům v podobě např. promáčknutí epidermis do dutin nalézajících se pod ní. Takto ošetřené vzorky byly v Laboratoři elektronové mikroskopie na Přf UK vysušeny metodou CPD (Critical Point Drying-pomocí CO_2) v aparatuře Bal-Tec CPD 030. Po vysušení byly vzorky rozmístěny na velmi tenké vrstvě pryskyřice (Tempfix Kit) na hliníkové terčíky a vhodně orientovány pomocí řasy upevněné ve speciálním držáku. Pro dosažení tenké a rovnoměrné vrstvy pryskyřice bylo použito podložního skla. Analyzační terčíky se následně nechaly pokrýt vrstvičkou zlata v aparatuře Bal-Tec SCD 050 a pozorovaly se pod skenovacím elektronovým mikroskopem JEOL 6380 LV.

3.4. Histologická analýza

Embrya pro histologickou analýzu byla odvodněna vzestupnou alkoholovou řadou a převedena přes noc do roztoku složek A+B pryskyřice JB-4 Embedding Kit (Polysciences, Inc.). Druhý den byly vzorky naorientovány do silikonové destičky (Polysciences, Inc.) a zality roztokem složek A+B+C, který bez přístupu vzduchu zpolymerizuje na pevnou pryskyřici. Dle standardního protokolu uváděného výrobcem by bločky měly polymerizovat 3 dny. Nicméně tento proces byl urychlen pomocí vysoušení v desikátoru za kontinuálního přístupu CO_2 po dobu 2 hodin. Díky této inovaci byla doba polymerizace výrazně zkrácena, což umožnilo efektivnější zpracování materiálu. Celý proces urychlení byl vylepšen díky příspěvku kolegy Mgr. Marka Romáška.

Zpolymerizované bločky byly poté nalepeny na plastové terčíky a nařezány na mikrotomu Leica RM 2155 na tloušťku 4-5 μm. Řezy byly přeneseny do kádinky s destilovanou vodou (kvůli snížení povrchového napětí), následně naorientovány na podložní sklíčko a vysušeny. Na obarvení byl použit roztok smíchány z histologických barviv AzurB, Eosinu (Serva) a destilované vody v poměru 4:1:125 a překryty krycími sklíčky nalepenými za pomoci pryskyřice DPX (Fluka). Po zatvrdnutí pryskyřice byly preparáty pozorovány pod mikroskopem Olympus BX 51. Snímky byly pořízeny pomocí kamery SPOT a programu Spot Advanced (Diagnostic Instruments).

3.5. Imunohistochemie

3.5.1. Whole-mount barvení (značení na celém embryu)

Před samotným značením protilátkami bylo potřeba eliminovat pigment, který by mohl maskovat kýžený signál. Pro tento účel posloužil roztok 30% H_2O_2 a metanolu (3:7), který se s embryi umístil pod přímé světlo a reakce byla průběžně pozorována až do úplné depigmentace.

Embrya zcela zbavená pigmentu bylo nutno perforovat 10% Tritonem X-100 (Sigma), aby protilátka mohla prostoupit do hlubších vrstev. Po promytí v 0,1M PBS byl vzorek promyt BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich), což pomáhá lepšímu navázání protilátky. Primární protilátka (HNK-1) byla použita v koncentraci 1:100 a ponechána na třepačce při pokojové teplotě cca 5 dní. Po odmytí primární

protilátky byl použit Vectastaine Elite ABC Kit (Vector), který umožňuje vizualizace protilátky ve viditelném světle pomocí křenové peroxidázy. Samotný signál (barva) byl vyvíjen v roztoku DAB (diamidobenzidinu).

Dále byly vyzkoušeny protilátky proti *krox20*, *AP-2* a *Slug* (SigmaAldrich), ovšem všechny tyto protilátky nefungovaly ani u jednoho studovaného druhu a proto je zde neuvádím.

3.5.2. Značení pomocí protilátek na řezech

Vzorky pro imunohistochemickou analýzu na řezech byly nejprve několikrát promyty 0,1M PBS, kvůli důkladnému odmytí fixativu. Následně bylo nutno vzorky prosytit 7,5% a 15% roztokem sacharózy po dobu 2,5 hodin ve 4°C a poté inkubovat v řadě roztoků 15% sacharózy se zvyšující se koncentrací želatiny (7,5%, 15% a 20%) po 12 hodinách ve vodní lázni o teplotě 37°C. Takto ošetřené vzorky se v 20% želatině zalily do silikonové formy (Polysciences, Inc.) a zamrazily na -25°C. Vzorky se upevnily na řezací terčíky pomocí Tissue Freezing Medium (Jung) a krájeny v kryostatu Leica CM 3050S na tloušťku 8-10 μm. Vzorky byly implementovány na nahřátá podložní sklíčka, která byla skladována do aplikace primární protilátky ve vlhké komůrce ve 4°C.

Před samotným značením bylo nutno řezy promýt 0,1M PBS, ošetřit 1% roztokem BSA a poté aplikovat primární protilátku (fibronektin, rabbit anti-human (Dako,1:100)). Sklíčka s primární protilátkou byla ponechána ve vlhké komůrce při teplotě 4°C přes noc. Následující den byla po odmytí primární protilátky použita sekundární protilátka goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen 1:500), která byla aplikována na 1,5 hodiny při pokojové teplotě. Pro lepší navázaní sekundární protilátky se sklíčka s řezy umístila na promývačku. Po odmytí nenavázané sekundární protilátky byla sklíčka zalita pomocí Vectashield Mounting Medium Hard Set (Vector), který obsahuje fluorescenční značku DAPI pro vizualizaci DNA v jádrech, a přikryta krycími sklíčky. Skladována byla při 4°C.

3.6. Injikace lipofilní barvy DiI

Pro značení migrujících buněk neurální lišty *in vivo* byla použita injikace lipofilní barvy DiI (1,1`-dioctadecyl 1-3,3,3`,3`-tetramethylindocarbocyanineperchlorate). Zásobní roztok DiI (10mg DiI v 50ml 100% ethanolu) byl ultrazvukem ošetřen kvůli přítomnosti potenciálních krystalů a rozředěn v poměru 1:7 s 10% sacharózou. Takto upravený finální roztok byl injikován buď pomocí mikroinjektoru IM 300 (WPI) či ústním injikátorem pomocí speciálně upravených skleněných jehel.

Po injikacích byla embrya ponechána dovyvinout se do potřebného stadia v roztoku E2 (zebrafish medium; Nüsslein-Volhard & Dahm, 2002).

3.7. Elektroporace

Na elektroporace byl použit elektroporátor Intracell Intracept TSS 10 ve vlastnictví 1. Lékařské fakulty UK v laboratoři prof. Miloše Grima. Při elektroporaci se DNA konstrukt injikoval pomocí ultratenkých skleněných kapilár do neurální trubice (Scaal et al., 2004) a následně se přenesl do neurální trubice za pomoci dvou elektrod využívajících elektrický gradient. V průběhu elektroporace bylo nutno dbát na vzdálenost elektrod od embrya, aby nedošlo k jeho spálení, ale zároveň musely být tyto dostatečně blízko, aby transport vůbec proběhl.

3.8. Značení pomocí CCFSE (Carboxyfluorescein)

Embrya před uzavřením neurálních valů byla dána na několik minut do roztoku CCFSE v PBS (30µl v 15ml) bez přístupu světla. Poté byla ponechána v E2 mediu až do vhodného stadia ontogenetického vývoje a poté fixována v 4%PFA. Barvení pomocí CCFSE označuje fluorescenčně povrchový ektodermem a z tohoto důvodu je možné sledovat osud ektodermu, případně i ektomezenchymových buněk (kupř. Griffith & Hay, 1992).

3.9. WISH (Whole-mount *in situ* hybridizace)

Při WISH bylo nejprve nutno embryo depigmentovat, viz podkapitola 3.5.1. Po depigmentaci byly vzorky vystaveny působení proteinázy K na 7 min (1:1000), především pro degradaci RNA vazebných proteinů a následně se vzorky

posfixovaly ve 4% PFA. Po krátké postfixaci se vzorky postupně převedly do hybridizačního roztoku a samotná hybridizace byla prováděna přes noc v hybridizačních komorách (Quanta BioTech a Boekel Bambino) při teplotě 60°C.

Následující den byly vzorky několikrát promyty v posthybridizačním rozrtoku (modifikovaný hybridizační roztok), převedeny do roztoku MABTween a ošetřeny blokovacím roztokem, který zabraňuje nespecifickým interakcím. Přes další noc byly vzorky inkubovány při 4°C s protilátkou, na které byla alkalická fosfatáza. Třetí den se vzorky promývaly v roztoku MABTween, což umožnilo odplavit nenavázanou protilátku.

Označené mRNA byly nakonec vizualizovány chromogenní reakcí, jíž se účastnil substrát pro alkalickou fosfatázu, který je přítomen v roztoku BM purple (Roche). Výsledný signál daného genu (v tomto případě Dlx3) v embryu vytvářel fialové zabarvení.

Použitá próba na gen *Dlx3* byla připravena kolegou Davidem Jandzikem, PhD. a darována naší laboratoři.

3.10. Obrazová analýza

Histologické a imunohistochemické preparáty byly analyzovány pod mikroskopem Olympus BX51, který je také vybaven integrovanou UV lampou. Fotografie se pořizovaly pomocí fotokamery SPOT. Fluorescenční fotografie byly upravovány a skládány do vícebarevné podoby pomocí programu Spot Advanced (Diagnostic Instruments). Některé protilátkou značené preparáty byly pozorovány v Laboratoři fluorescenční mikroskopie na konfokálním mikroskopu (Leica TCS SP2 s AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter) systémem). Extirpovaná embrya byla pozorována pod binokulární lupou Olympus SZX 12 s kamerou Olympus, která umožňuje skládání z více nasnímaných vrstev (DeepFocus) za pomoci softwaru QuickPhoto Micro (Promicra). Injikace embryí probíhala pod fluorescenční binolupou Olympus IX 81 a fotografovala se kamerou Orca Hamamatsu Photonics Camera.

Finální úprava fotografií se prováděla v programu Adobe Photoshop CS a FIJI (ImageJ) Schémata byla vytvářena v programu Corel Draw využívající vektorovou grafiku.

4. Seznam zkratek

B	Branchiální proud
c	coelom
co	cementový orgán
ent	entoderm
exg	vnější žábra
f	farynx
g	ganglium
H	Hyoidní proud
hg	příchytná žláza
ht	srdce
mes	mesencephalon
mmez	mezodermální mezenchym
mnc	mandibulární kavita
not	notochord
olf	čichový váček
optv	optický váček
otv	otická kapsule
p1	1. faryngeální výchlipka
p2	2. faryngeální výchlipka
pin	pineální orgán
pog	přední část embryonálního střeva
prmc	premandibulární kavita
pron	pronefros
pros	prosencephalon

r2	2. rhombomera
r3	3. rhombomera
r4	4. rhombomera
r5	5. rhombomera
rhom	rhombencephalon
s	somit
s1 – Tab 6,3	1. somit
s2	2. somit
s3	3. somit
t	ocas
TRI	Trigeminální proud
IV.	4. mozková komora
V.	5. hlavový nerv
VII.	7. hlavový nerv
IX.	9. hlavový nerv

5. Výsledky

5.1. Bichir senegalský (*Polypterus senegalus*)

5.1.1. Vnější morfologie (SEM)

Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) byly pořízeny za účelem popisu vnější morfologie bichira od procesů neurulace až po stadium rané larvy. Takto získané informace posloužily k pochopení rané morfogeneze tkání bichira.

Ve stadiu 21 (dle Diedhiou & Bartsch, 2009) (Tab. 1 A, A') nejsou neurální valy dosud zcela splynulé: zatímco v posteriorní části embrya se už dotýkají (tzn. splynutí neurálních valů je zde rychlejší), v anteriorní části je rozestup neurálních valů výrazně větší, jelikož se zde diferencuje budoucí mozek a dochází k aktivní morfogenezi této oblasti. Ve stadiu 21 je už také vidět nepatrné vyboulení (Tab. 1 A'), které indikuje místo vzniku budoucí vnější žábry. Jak bude ukázáno později, toto vyboulení je způsobeno velmi rannou a masivní migrací hyoidního proudu neurální lišty (Tab. 2 A, B). V následujícím stadiu 22 dochází ke kompletnímu splynutí neurálních valů (Tab 1.B, B') a lze pozorovat výrazné primordium vnější žábry. Pro stadium 23 je charakteristická přítomnost dvou dobře definovaných ranně se zakládajících larválních struktur, vnějších žaber a cementových orgánů (Tab. 1 C, C'). Cementové orgány se nacházejí v anteriorní části vznikající hlavy, zatímco v hyoidní oblasti prominuje primordium vnějších žaber. Ve stadiu 24 se embryo začíná prodlužovat, takže jeho celková velikost začíná přesahovat žloutkovou kouli. Embryonální mozek je v této fázi ontogeneze rozdělen do tří dobře rozlišitelných částí, na prosencephalon, mesencephalon a rhombencephalon. Cementové orgány se v rostrální části ještě více zvětšují a nabývají pro ně typické kulovité podoby. Vnější žábry se prodlužují laterálním směrem a mají polokulovitý tvar (Tab. 1 D, D'). Další stadium (st. 25) je špatně rozlišitelné od předchozího stadia, v hlavové oblasti je jediným vodítkem více prominující pineální organ (Tab. 1 E). Nejlepším znakem pro odlišení stadia 25 a 24 je velikost ocasní části embrya, která je ve stadiu 25 přibližně dvakrát delší oproti stadiu předešlému (Tab. 1 E).

5.1.2. Extirpace povrchového ektodermu a analýza pomocí SEM

Pro základní poznání celé migrace hlavové neurální lišty byla použita metoda, při které je za pomocí extirpace odstraněn povrchový ektoderm a takto odoperovaná embrya se poté analyzují pomocí SEM. Tato metoda má obrovskou výhodu, jelikož při správně provedené operaci poskytuje detailní informace o kontextu ve vyvíjející se hlavě a lze vizualizovat celou migrační patrnost (angl. pattern) hlavové neurální lišty. Obrovskou nevýhodou nicméně zůstává technická náročnost a zručnost povedení a též použití velkého množství embryí.

Nejranější stadium, u kterého se zadařilo odstranit epidermis a dále jej analyzovat, bylo stadium 22. U mladších stadií se extirpace epidermis dokonale nezdařily, jelikož jednotlivé vrstvy zárodečných listů se nacházejí ve velmi těsném kontaktu a nemohla být selektivně odstraněna pouze jedna epiteliální vrstva. Ve stadiu 22 lze dobře rozlišit trigeminální a hyoidní proud buněk neurální lišty (Tab. 2 A, B). Trigeminální proud migruje pouze z anteriorní části prosencephala a přes primordium oka. Hyoidní proud migruje z oblasti rhombencephala a je oproti trigeminálnímu velice urychlen, protože je vidět mnohem ventrálněji než trigeminální proud (Tab. 2 A). Také početnost buněk tvořících hyoidní proud je zřetelně mnohem větší, než je tomu u proudu trigeminálního. Zatímco trigeminální proud se ještě nachází na úrovni neurální trubice, hyoidní proud už odmigroval z této úrovně a osidluje oblast budoucí vnější žábry; na dorzální straně faryngu narušuje celistvost tohoto proudu evaginace entodermu mezi prvním a druhým faryngeálním obloukem, která přispívá k morfogenezi vnější žábry (Tab. 2 B) (srovnej také Crkvová, 2012). Buňky neurální lišty migrují kolem této překážky, spočívající v pevném kontaktu mezi evaginujícím se entodermem a vnějším ektodermem.

Ve stadiu 23 trigeminální proud zvyšuje počet svých buněk a stále migruje přes oční primordium (Tab. 2 D). Hyoidní proud osidluje celé primordium vnější žábry, pouze v jeho posteriorní části nepokrývá celistvý entoderm hyoidní výchlipky (Tab. 2 C). V následujícím stadiu (24) je situace velmi podobná, ale vůbec poprvé lze identifikovat branchiální proud buněk neurální lišty (Tab. 2 E). V tomto stadiu se také prolamuje první faryngeální výchlipka, která pomáhá rozlišení trigeminálního a hyoidního proudu (Tab. 2 E, F). Ve stadiu 24 se v hyoidní oblasti objevuje otická

kapsule, která se zanořuje do migračního proudu buněk neurální lišty v hyoidní oblasti (Tab. 2 F) a později se vmezeří mezi hyoidní a branchiální migrační proud neurální lišty, čímž napomáhá k rozlišení obou migračních proudů. Dále se zvětšuje masivnost evaginujícího entodermu v posteriorním směru.

stadium 25 bylo poslední, které bylo za tímto účelem analyzováno. V tomto stadiu trigeminální proud obchází zvětšené oční primordium (Tab. 2 G, H), posteriorně od očního primordia je také možno pozorovat vznikající ganglia V. hlavového nervu (Tab. 2 G). Hyoidní proud osidluje celou oblast vnější žábry a část tohoto proudu lze také pozorovat na otické kapsuli. Buňky branchiálního proudu migrují posteriorně od otické kapsule a také jsou zde patrny další zakládající se nervová ganglia (Tab 2. G).

Můžeme tedy shrnout, že analýza za pomocí SEM mj. ukázala, že migrační patrnost buněk neurální lišty u bichira senegalského je změněna oproti očekávanému klasickému schématu – druhý, hyoidní proud migruje rozsáhleji a dříve, než-li proud první, trigeminální (Tab. 2).

5.1.3. Histologická analýza (JB-4 pryskyřice)

Histologická analýza umožňuje pochopit detaily migrace neurální lišty na buněčné úrovni (např. procesy vznikání) a také poskytuje možnost analyzovat raná embrya, u kterých bylo velice těžké bezrozporně odstranit povrchový ektoderm a přesně rozlišit epidermis od buněk neurální lišty. Pomocí této techniky chci také testovat předchozí nález o heterochronii v migrační patrnosti buněk neurální lišty u bichira

Nejmladší stadium bichira, které bylo histologicky analyzováno a barveno pomocí metody Azure B/ Eosinu, bylo stadium 20, což je stadium ještě rané neurulace. Na frontálním řezu mandibulární oblastí žádné buňky neurální lišty dosud nelze pozorovat (Tab. 3 A): povrchový epitel zde velmi těsně přiléhá k epitelu budoucí, stále ještě široce otevřené neurální trubice a vytváří tak neprostupnou bariéru pro jakékoli migrující buňky (Tab. 3 A). V hyoidní oblasti stejného stadia je však již možné identifikovat epitelo-mezenchymální tranzici (Tab. 3 B, B´), což je umožněno rozvolněním vnějšího epitelu od epitelu budoucí neurální trubice a může tak vzniknout prostor pro migrující buňky neurální lišty. V branchiální oblasti je opět pozorován blízký kontakt epitelů a žádné migrující buňky

zde nelze identifikovat (Tab. 3 C). Situace u stadia 21 (Tab. 3 D-F) je velmi podobná předchozí ve stadiu 20. Zatímco trigeminální proud či migrace se dosud neustavily (Tab. 3D), na frontálním řezu hyoidní oblastí lze již pozorovat poměrně kompaktní migrační proud (Tab. 3 E,E´), který migruje směrem k laterálně rozprostřenému mezodermálnímu mezenchymu. V branchiální oblasti je možno identifikovat první somit, ale epitely jsou stále ve velmi těsném kontaktu a není zde prostor pro migraci neurální lišty (Tab. 3 F).

Ve stadiu 22 by už dle předchozích extirpačních experimentů a následné SEM analýzy měl trigeminální proud neurální lišty migrovat. Avšak na frontálních řezech mnou analyzovanými embryi nelze identifikovat mezenchymální populaci v oblasti prosencephala: epitely jsou zde stále ve velmi těsném kontaktu (Tab. 4 A). Vysvětlení tohoto nálezu bude nejspíše spočívat ve velmi nízkém rozškálování jednotlivých stadií v průběhu raného vývoje bichira. V hyoidní oblasti je naproti tomu migrace dobře vidět a je velmi masivní oproti předchozím stadiím (Tab. 4 B, B´,C). Početnost hyoidního proudu narůstá na anterio-posteriorní ose, jelikož anteriorní část hyoidní proudu teprve prodělává epitelo-mezenchymální tranzici (Tab. 4 B,B´) a v posteriorní části jsou vidět souvislé migrační kompartmenty (Tab. 4 C). V branchiální oblasti ve stadiu 22 nelze žádné mezenchymatické buňky původu neurální lišty pozorovat (Tab. 4 D), nicméně lze však v tomto forntálním řezu identifikovat počínající destičkovité ztlušťování potvrchového ektodermu, kterým je otická plakoda (Tab. 4 D).

Ve stadiu 23 prominují v anteriorní části hlavy párové larvální cementové orgány (Tab. 1 C,D). Na frontálním řezu vedeném mezi cementovými orgány a primordiem oka jsem zachytil mezenchymatickou populaci, nacházející se pod mozkem (Tab. 4 E). Z toho řezu bohužel nelze rozhodnout o původu mezenchymu. V mandibulární oblasti za optickým váčkem lze pozorovat migraci trigeminálního proudu z dorzální strany neurální trubice (Tab. 4 F, F´). Hyoidní proud lze stále pozorovat, ale nelze přesně rozpoznat, kam až ventrálně dosahuje, jelikož se jednotlivé mezenchymální populace ve ventrální části faryngu již špatně rozlišují. Ve stadiu 23 je možné pozorovat dobře patrnou IV. mozkovou komoru (Tab. 4 G). Otická plakoda je již ve stadiu 23 velmi dobře rozpoznatelná a nabývá svého charakteristické tvaru (Tab. 4 H). Posteriorně od otické plakody jsem na řezech poprvé identifikoval migrující buňky branchiálního proudu neurální lišty (Tab. 4 I).

Posledním histologicky analyzovaným stadiem bylo stadium 24. Buňky trigeminálního proudu jsem nalezl nad optickým váčkem (Tab 5. A). Trigeminální proud je možné sledovat také posteriorněji od optického váčku (Tab. 5 B,B´,C,C´). Hyoidní migrační proud je vidět jak dosahuje entodermálního výběžku faryngu, podílejícího se na vývoji vnější žábry (Tab. 5D). Hned další posteriorně umístěný řez ukazuje, jak hyoidní migrační proud vyplňuje zcela vnější žábru (Tab. 5 E). Zajímavá je situace v oblasti otické plakody, která definuje okraj vnější žábry a tím také hyoidní oblast. V anteriorní části lze pozorovat mezenchymatické buňky na její dorzální straně, mezenchymatické buňky však obcházející otickou kapsuli i po vnitřní straně (Tab. 5 E). Na frontálním řezu lokalizovaném posteriorněji od řezu předchozího lze pozorovat mezenchymatické buňky migrující mezi vnějším ektodermem a otickou kapsulí (Tab. 5 F, F´). Posteriorně od otické plakody lze pozorovat buňky branchiálního migračního proudu, které vytvářejí nevýrazný proud, možná budoucí nerv, a migrují v blízkosti prvního somitu (Tab. 5 G). Ve stadiu 24 se mi také možná podařilo poprvé identifikovat migrující první buňky trupové neurální lišty (Tab. 5 H, H´).

5.1.4. Imunohistochemie

Pro potvrzení nalezených skutečností v histologické analýze jsem se rozhodl využít imunohistochemického značení pomocí protilátky proti fibronektinu, která umožňuje vizualizovat bazální laminy mezi epiteliálními tkáněmi a tak vyjasnit přesnou pozici jednotlivých epitelů.

Bichir je nemodelovým druhem, a proto je nutné uvažovat o specificitě imunohistochemického značení, nicméně protilátka proti fibronektinu již byla v naší laboratoři úspěšně na bichirovi použita (Minařík, 2011; Crkvová, 2012). Pro imunohistochemické značení jsem klíčová stadia nařezal v kryostatu v horizontální a frontální rovině. Dle mých předpokladů měly frontální řezy potvrdit pozici vmezeřené neurální lišty mezi povrchovým epitelem a epitely vnitřních struktur (neurální trubice, optická a otická kapsule a další). Horizontálními řezy jsem chtěl vizualizovat pozici mezenchymu neurální lišty vůči mezodermálnímu mezenchymu při utváření faryngeálních oblouků. Z provedených analýz je nicméně vidět, že hranice epitelů během neurulace a postneurulace v anteriorní části embrya je velmi

nejasná oproti kupř. trupové části embrya. Nejasné hranice epitelů zřejmě souvisí s vysokou morfogenetickou aktivitou ve vývoji hlavy.

Na frontálním řezu stadia 24 v hyoidní oblasti lze identifikovat buňky neurální lišty, hyoidního proudu, migrující z dorzální části neurální trubice směrem k otické kapsuli (Tab. 6 A). Na tomto řezu je také identifikován mezodermální mezenchym, který se nachází ventro-mediálně od otické kapsule. V trupové části je signál protilátky proti fibronektinu mnohem silnější, což lze dobře vidět na vizualizaci hranic somitů (Tab. 6 B); na tomto řezu je možné také pozorovat buňky trupové neurální lišty, které se nacházejí dorzálně od somitu a vytvářejí jakýsi malý snopec buněk (Tab. 6 B, B´).

Na horizontálních řezech stadiem 24 lze dobře odlišit části jednotlivých hlavových migračních proudů (Tab. 6 C, D). Na horizontálním řezu ventrální částí embrya lze také krom trigeminálního proudu odlišit evaginující entoderm v hyoidní oblasti, který se podílí na vývoji vnějších žaber bichira (Tab. 6 C). Horizontální řez dorzální části embrya ve stadiu 24 odhaluje mezenchymatické buňky původu neurální lišty migrující přes otickou kapsuli (Tab. 6 D). Nicméně na řezech horizontální rovinou u bichira nelze komplexně popsat migrační patrnost buněk neurální lišty v průběhu faryngogeneze (srovnej s axolotlem, Cerny *et* al., 2004 či jeseterem Tab. 11).

Kromě protilátky proti fibronektinu jsem se pokusil využít také komerčně dostupné protilátky proti proteinu *krox20* a anti-*Slug* a *AP-2* protilátky, což by mi umožnilo lépe pochopit detaily migrace hlavové neurální lišty. Všechny tyto pokusy se však nezdařily a neúspěch zřejmě souvisí s komplikovanou funkčností protilátek u nemodelových druhů.

Buňky neurální lišty jsem se také pokusil značit klasickou protilátkou HNK-1, která byla u několika druhů použita ke značení migrující neurální lišty (Bronner-Fraser, 1986; Erickson *et* al., 1989; Sadaghiani & Vielkind, 1990) či ke značení vyvíjejích se nervů (Kuratani *et* al, 2000). HNK-1 protilátku jsem vyzkoušel na celých embryích i na řezech, ale u bichira nefungovala.

5.1.5. Vitální barvení lipofilním markerem DiI

Pomocí injikace lipofilní značky DiI je možné vizualizovat selektivně migrující buňky neurální lišty (srovnej Materiál a metody). Proto jsem se rozhodl použít tuto metodu, abych potvrdil data získaná z předchozích analýz. Tato metoda je technicky náročná a navíc značení je prováděno na živých embryích, což vyžaduje velké množství embryonálního materiálu a po injikaci je nutné zajistit jejich přežití do kýženého stáří.

Injikační experimenty se mi díky nedostatku živého materiálu podařilo provést pouze jednou. Celkem jsem injikoval do neurálních valů 40 embryí ve stadiu 21, z čehož po několikahodinové kontrole přežilo a mělo pozitivní signál 12 z nich. Injikaci jsem prováděl z laterální strany neurálních valů (viz Tab. 7 C), čímž jsem se pokusil eliminovat problém s injikací nechtěných tkání. Při injikaci z laterální strany může dojít pouze k označení buňek neurální lišty a povrchového ektodermu, protože jak je vidět z histologických dat, žádné jiné tkáně se v dorzální části neurálních valů nenacházejí.

Všech 12 embryí vykazovalo pozitivní signál v migrujících buňkách a u několika z nich signál vypadal shodně s daty získanými extirpačními experimenty (Tab. 7 A, B). Abych potvrdil, že DiI je navázána pouze v mezenchymu původem z neurální lišty, embrya jsem následně histologicky zpracoval (n=12). Z histologických dat je nicméně vidět, že během injikace poměrně často došlo k označení další buněčné populace, především mezodermálního mezenchymu (Tab. 7 A´). U některých injikovaných embryí histologicky zpracovaných lze získaný signál velmi komplikovaně odlišit, nálézá-li se v buňkách neurální lišty či v mezodermálním mezechymu (Tab. 7 B´).

Mimo injikace buněčného markeru DiI jsem také použil značení pomocí CCFSE (pro detaily viz kapitola Materiál a metody), které primárně značí povrchový ektoderm. V mém případě jsem toto značení použil na embrya s otevřenými neurálními valy, protože tuto dobu dochází k emigraci buněk neurální lišty. Jelikož buňky neurální lišty vznikají z ektodermu neurálních valů, během epitelo-mezenchymálního přechodu a poté migrují, ponesou si značku CCFSE s sebou v průběhu migrace a mohou tak být snadno detekovatelné. Tato metoda se neosvědčila, jelikož se ukázalo, že cilie, která má embryo bichira hojně na svém

povrchu, svou činností odmyjí tuto značku ze svého povrchu, ikdyž se zprvu jevil experiment pozitivně (Tab. 7 D).

5.1.6. *In situ* hybridizace

Pro další potvrzení dat získaných z předešlých experimentů jsem se rozhodl využít molekulárně-biologické metody *in situ* hybridizací na celých embryích (WISH), při kterých je možné vizualizovat expresi studovaného genu. Tato metoda funguje na základě komplementarity sondy s navázanou protilátkou (tzv. próby) a sekvencí genu. Jelikož v naší laboratoři disponujeme širokou škálou sond, rozhodl jsem se vyzkoušet sondu proti genu *Dlx3*, což je gen, který by měl být exprimován mimo jiné právě i v průběhu migrace neurální lišty. Gen *Dlx3* má expresi vždy v ploutevním lemu, což může být použito jako kontrola specificity použité próby(Akimenko *et* al., 1994).

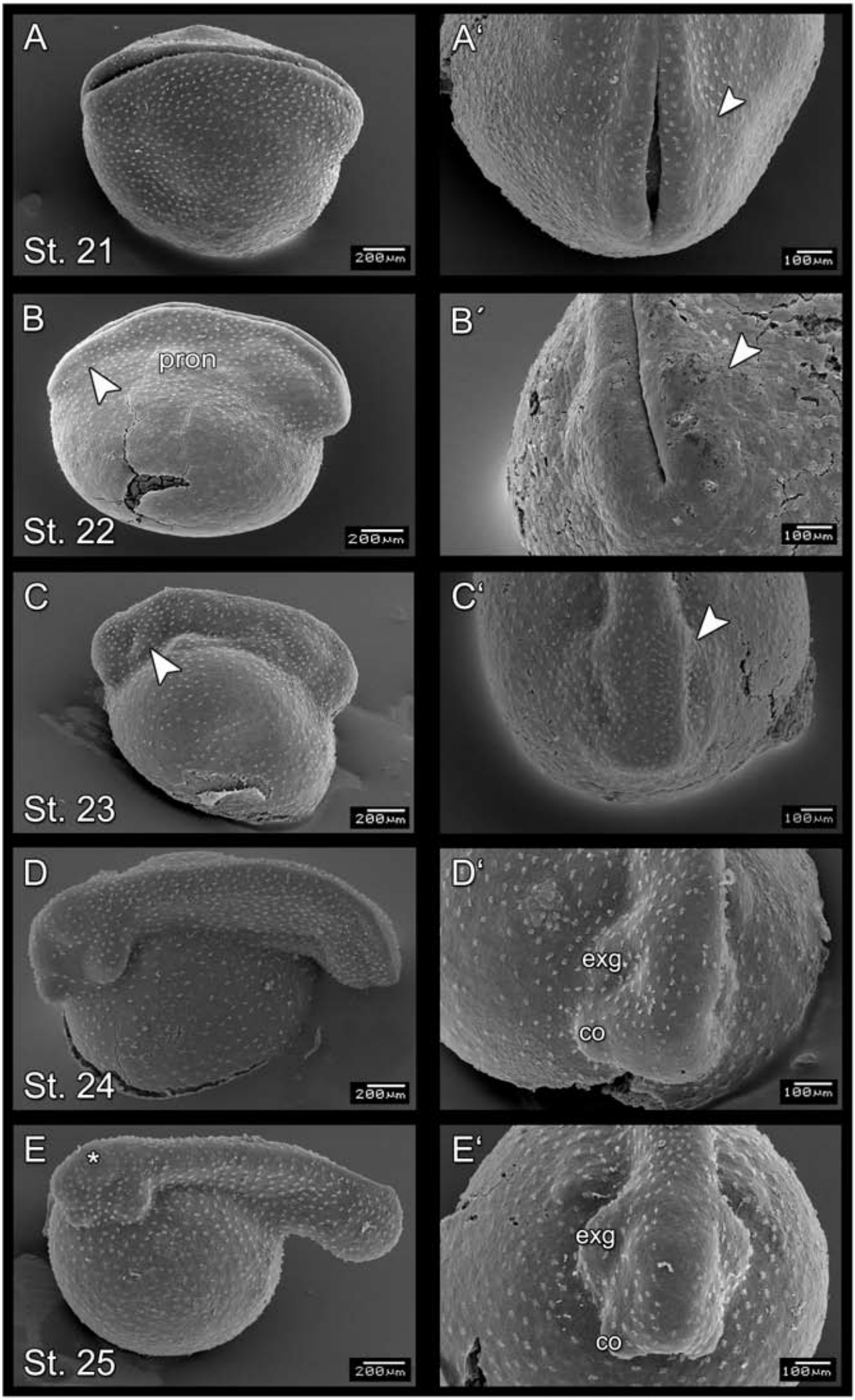
Prvním stadiem, u kterého byla exprese genu *Dlx3* detailně analyzována, bylo stadium 23 (Tab. 8 A, B). V tomto stadiu je možné pozorovat silnou expresi genu *Dlx3* v hyoidní oblasti, která je lokalizována ventrálně od rhombencephala (Tab 8 A, B). Expresi genu *Dlx3* lze také pozorovat v nejvíce anteriorní části hlavy, kde jsou přítomny buňky trigeminálního proudu neurální lišty (srovnej Tab. 2), která zřejmě souvisí se silnou kondenzací buněk trigeminálního proudu v této oblasti (Tab. 8 B). Rozsah trigeminálního proudu neurální lišty je mnohem masivnější, jak ukazují data z extripačních experimentů, kde jsou buňky trigeminálního proudu lokalizovány až na hranici mesencephala (Tab. 2D). Tomuto rozsahu může odpovídat slabá exprese genu *Dlx3*, která může být ovlivněna menším počtem buněk trigeminálního proudu v této pozici (srovnej Tab. 8B a Tab. 2D).

Ve stadiu 24 je exprese genu *Dlx3* patrná dorzálně od cementového orgánu, ale už nelze pozorovat expresní signál na dorzální straně prosencephala (Tab. 8 C, D). Podoba této exprese by tedy naznačovala, že exprese genu *Dlx3* v tomto stadiu se nachází v těch buňkách trigeminálního proudu neurální lišty, které se nalézají pouze v oblasti cementových orgánů, zatímco v buňkách na dorzální straně neurální trubice exprese chybí. Silná exprese v buňkách hyoidního proudu neurální lišty je rozeznatelná i ve ventrální části primordia budoucí vnější žábry (Tab. 8 C). Při dorzálním pohledu na hlavou část embrya je možné identifikovat

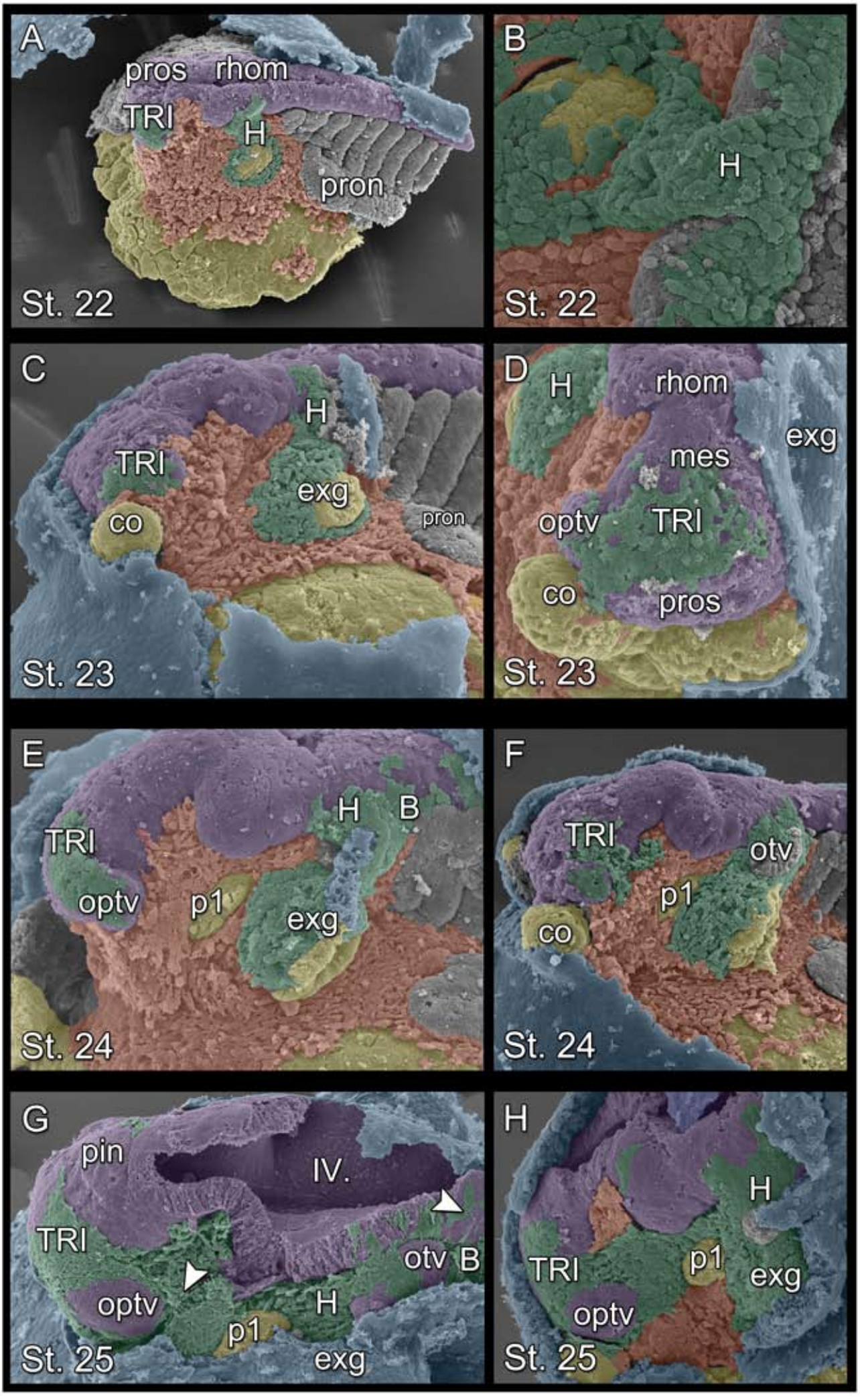
expresi genu *Dlx3* v primordiu vnější žábry, kde vytváří expresní patrnost ve tvaru obráceného písmene L (Tab. 8 D).

V nejstarším analyzovaném stadiu bichira (st. 25) je exprese genu *Dlx3* v trigeminálním oblasti rozeznatelná pouze ve velmi malém rozsahu dorzálně od cementového orgánu (Tab. 8 E). Exprese v hyoidní oblasti je ve stadiu 25 lokalizována pouze v nejvíce posteriorní části primordia budoucí vnější žábry (Tab. 8 E) a výše popsaná expresní patrnost v podobě obraceného písmene L je zde stále dobře pozorovatelná (Tab. 8 F).

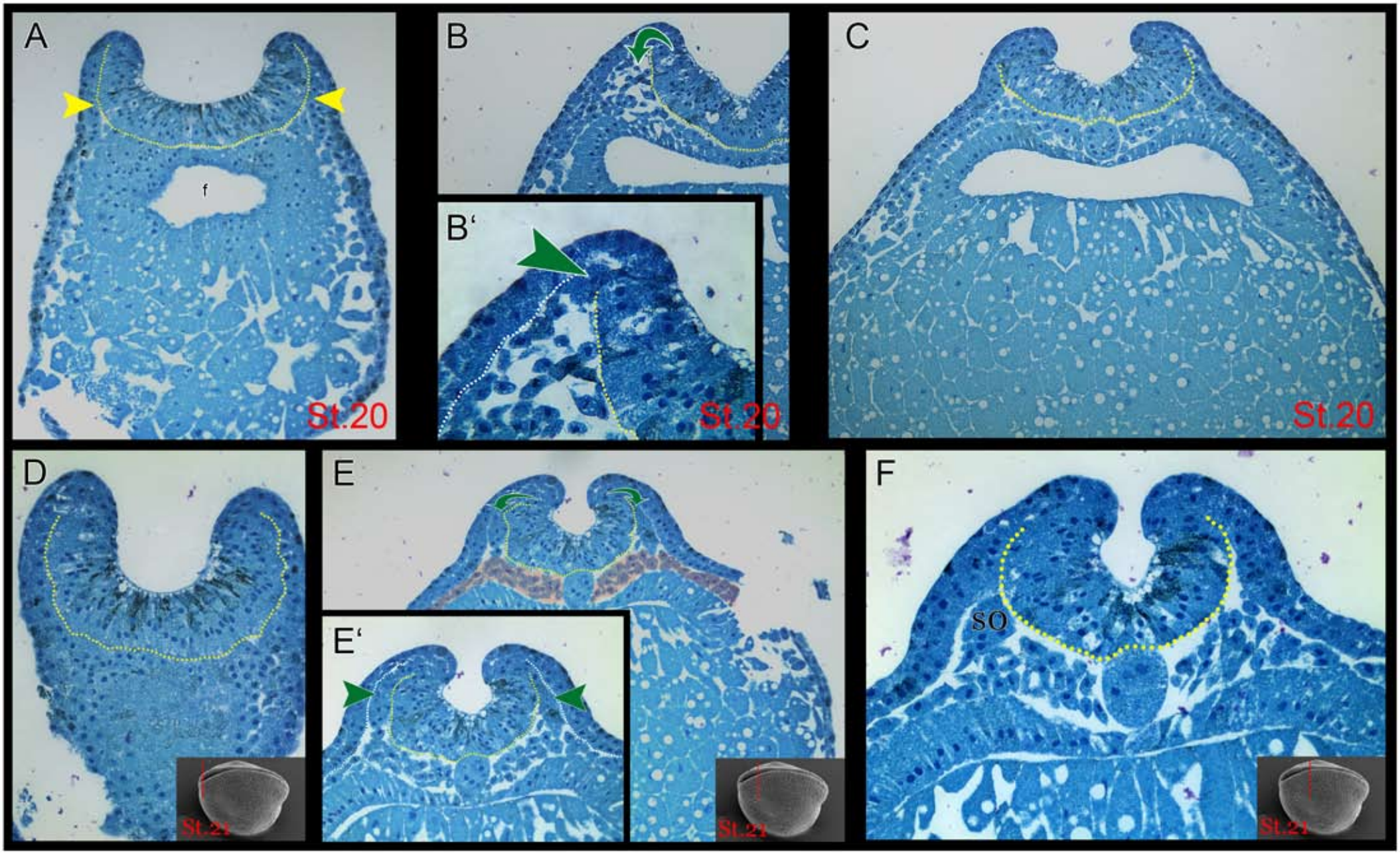
Tabulka 1: Raný vývoj bichira senegalského *Polypterus senegalus* (SEM). **(A - E)** Laterální pohled na jednotlivá stadia od rané neurulace po ranou larvu. **(A´ - E´)** Dorzální pohled na hlavovou oblast jednotlivých stádií; šipka označuje hyoidní oblast; hvězdička značí vyvíjející se pineální orgán; snímky B a B´ pořídil Mgr. Martin Minařík


A
St. 21
200µm
A‘
100µm
B
pron
St. 22
200µm
B´
100µm
C
St. 23
200µm
C‘
100µm
D
St. 24
200µm
D‘
exg
co
100µm
E
*
St. 25
200µm
E‘
exg
co
100µm

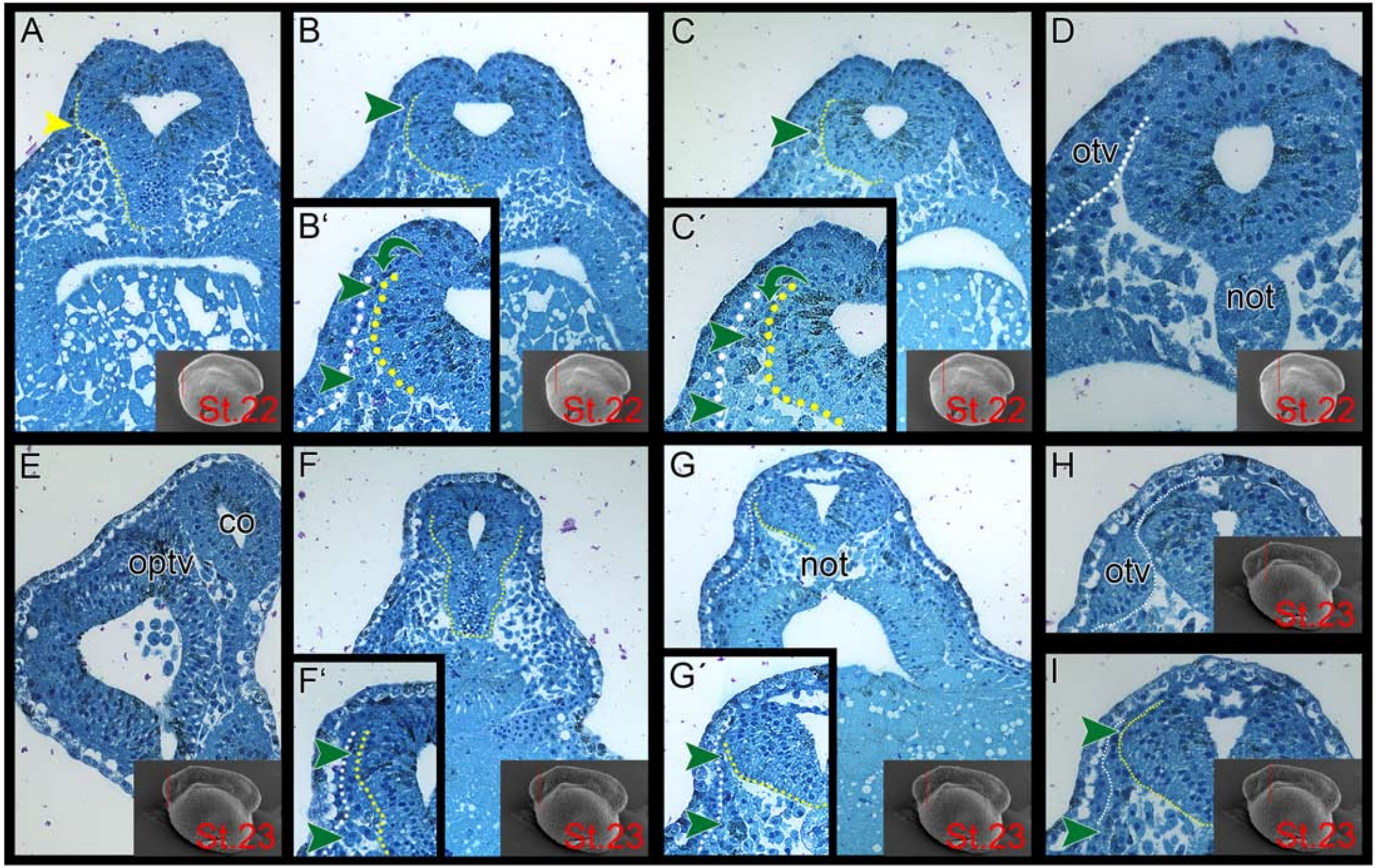
Tabulka 2: Migrace hlavové neurální lišty bichira seneglaského (Extirpace a SEM analýza). **(A)** Dorzální pohled na trigeminální a hyoidní proud hlavové neurální lišty ve stadiu 22. **(B)** Detail hyoidního proudu hlavové neurální lišty ve stadiu 22. **(C)** Laterální pohled na trigeminální a hyoidní proud neurální lišty ve stadiu 23. **(D)** Dorzální pohled na anteriorní část hlavové oblasti ve stadiu 23. **(E - F)** Laterální pohled na trigeminální, hyoidní a branchiální proud hlavové neurální lišty ve stadiu 24. **(G - H)** Laterální pohled na trigeminální, hyoidní a branchiální proud neurální lišty; šipka označuje vznikající neurální ganglia.


A
pros
rhom
TRI
H
pron
St. 22
B
H
St. 22
C
H
TRI
exg
co
pron
St. 23
D
H
rhom
exg
mes
optv
TRI
co
pros
St. 23
E
H
B
TRI
optv
p1
exg
St. 24
F
TRI
otv
p1
co
St. 24
G
pin
IV.
TRI
otv
B
optv
H
p1
exg
St. 25
H
H
TRI
p1
exg
optv
St. 25

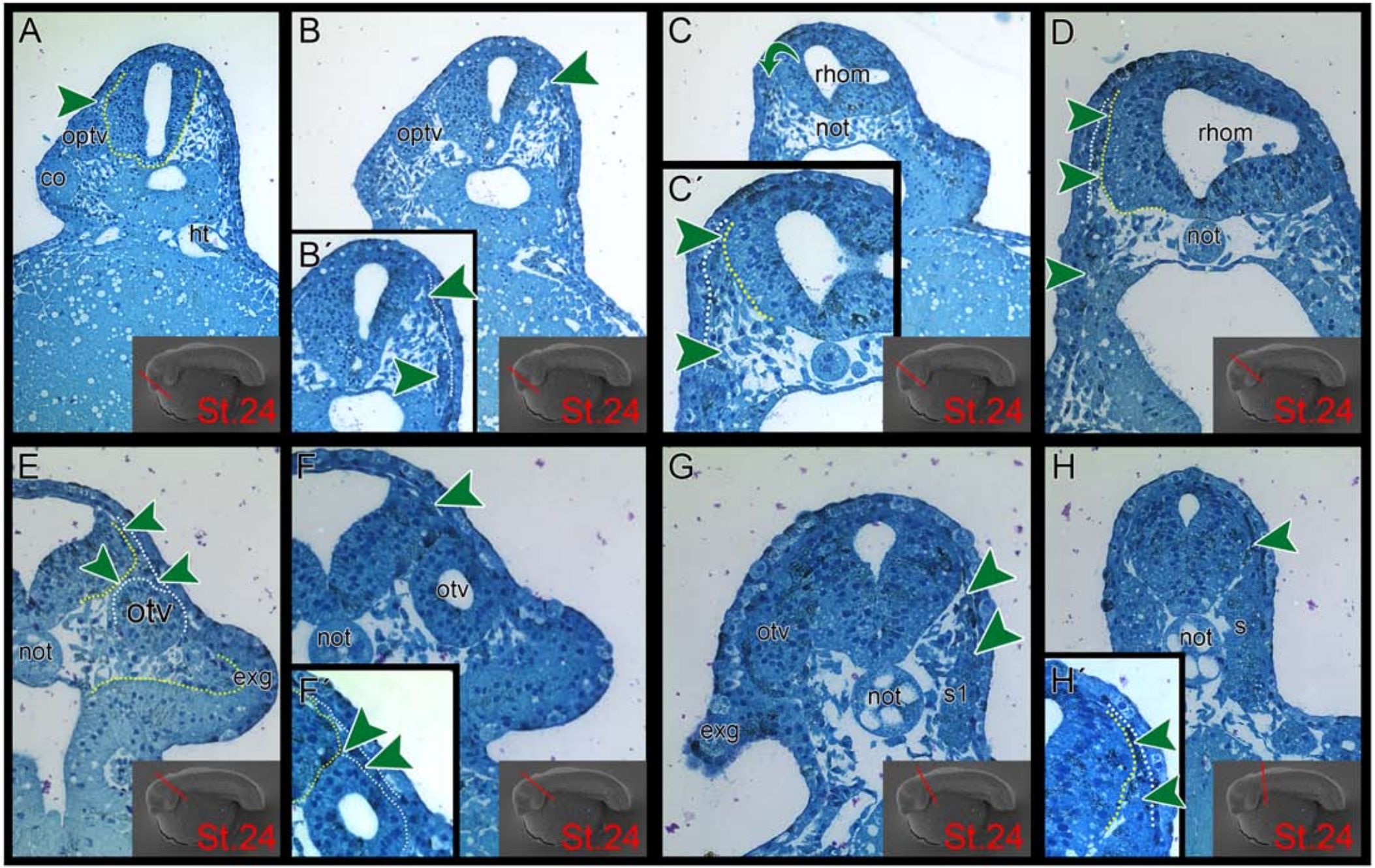
Tabulka 3: Heterochronie v emigraci hyoidního proudu hlavové neurální lišty (JB-4 histologie). **(A - C)** Frontální řezy stádiem 20. **(D - F)** Frontální řez stádiem 21. **(A)** Frontální řez mandibulární oblastí stadia 20. **(B)** Frontální řez hyoidní oblastí stadia 20. **(B´)** Detail dorzální části neurálního valu v hyoidní oblasti stadia 20. **(C)** Frontální řez branchiální oblastí stadia 20. **(D)** Frontální řez mandibulární oblastí stadia 21.**(E)** Frontální řez hyoidní oblastí stadia 21. **(E´)** Detail neurální trubice v hyoidní oblasti stadia 21. **(F)** Frontální řez branchiální oblastí stadia 21; žlutá oblast značí hranice neurální trubice; bílá oblast značí bazální laminu vnějšího epitelu. žlutá šipka značí kontakt vnějšího epitelu s epitelem neurální trubice; zelená šipka označuje buňky hlavové neurální lišty; v rámečku SEM snímek stadia 21 **(D - F).**


A
f
St.20
B
B‘
St.20
C
St.20
D
St.21
E
E‘
St.21
F
SO
St.21

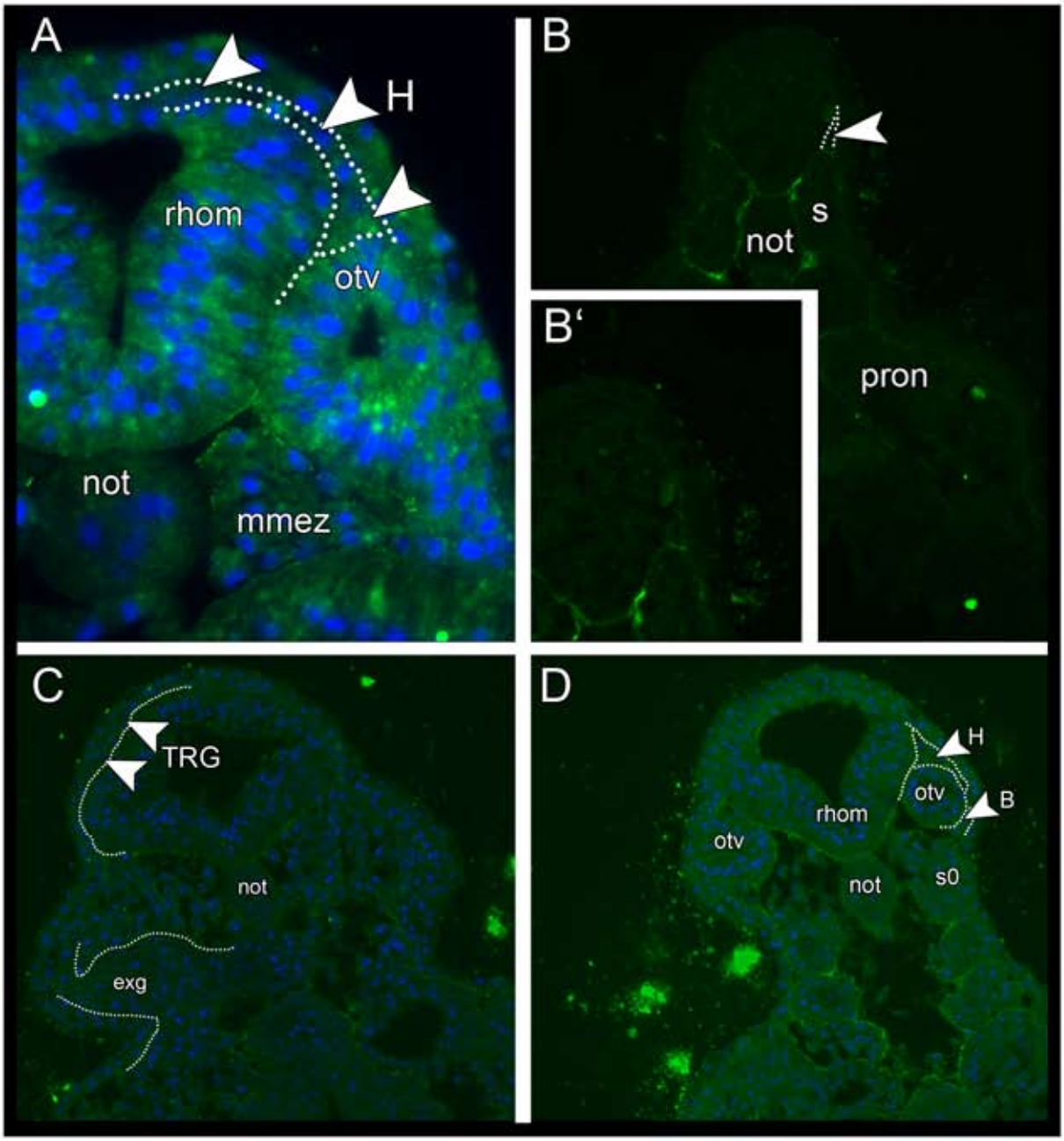
Tabulka 4: Vznik migračních proudů hlavové neurální lišty bichira senegalského (JB-4 histologie). **(A-D)** Frontální řezy stádiem 22. **(A)** Frontální řez rostrální částí mandibulární oblasti stadia 22. **(B)** Frontální řez posteriorní částí mandibulární oblasti stadia 22. **(B´)** Detail vrcholku neurální trubice v mandibulární oblasti s vyznačenými emigrujícími buňkami trigeminálního proudu. **(C)** Frontální řez hyoidní oblastí stadia 22 s vyznačenými migrujícími buňkami hyoidního proudu hlavové neurální lišty. **(D)** Frontální řez hranicí mezi hyoidní a branchiální oblastí stadia 22. Vizualizována vznikající otická plakoda. **(E - I)** Frontální řezy stádiem 23. **(E)** Frontální řez mandibulární oblastí a cementovými orgány; Snímek ve vertikální rovině. **(F)** Frontální řez mandibulární oblastí stadia 23 za cementovými orgány. **(F´)** Detail zaměřený na migrující buňky trigeminálního proudu hlavové neurální lišty. **(G)** Frontální řez hyoidní oblastí s vyznačenými buňkami hyoidního proudu neurální lišty. **(H)** Frontální řez oblastí stadia 23 s vyvíjející se otickou plakodou. **(I)** Frontální řez branchiální oblastí stadia 23 s vyznačenými migrujícími buňkami branchiálního proudu hlavové neurální lišty; žlutá oblast značí hranice neurální trubice; bílá oblast značí bazální laminu vnějšího epitelu. žlutá šipka značí kontakt vnějšího epitelu s epitelem neurální trubice; zelená šipka označuje buňky hlavové neurální lišty; v rámečku SEM snímek stadia 22 **(A - D)** a stadia 23 **(E – I).**


A
B
B‘
C
C´
D
otv
not
St.22
E
co
optv
F
F‘
G
not
G´
H
otv
St.23
I

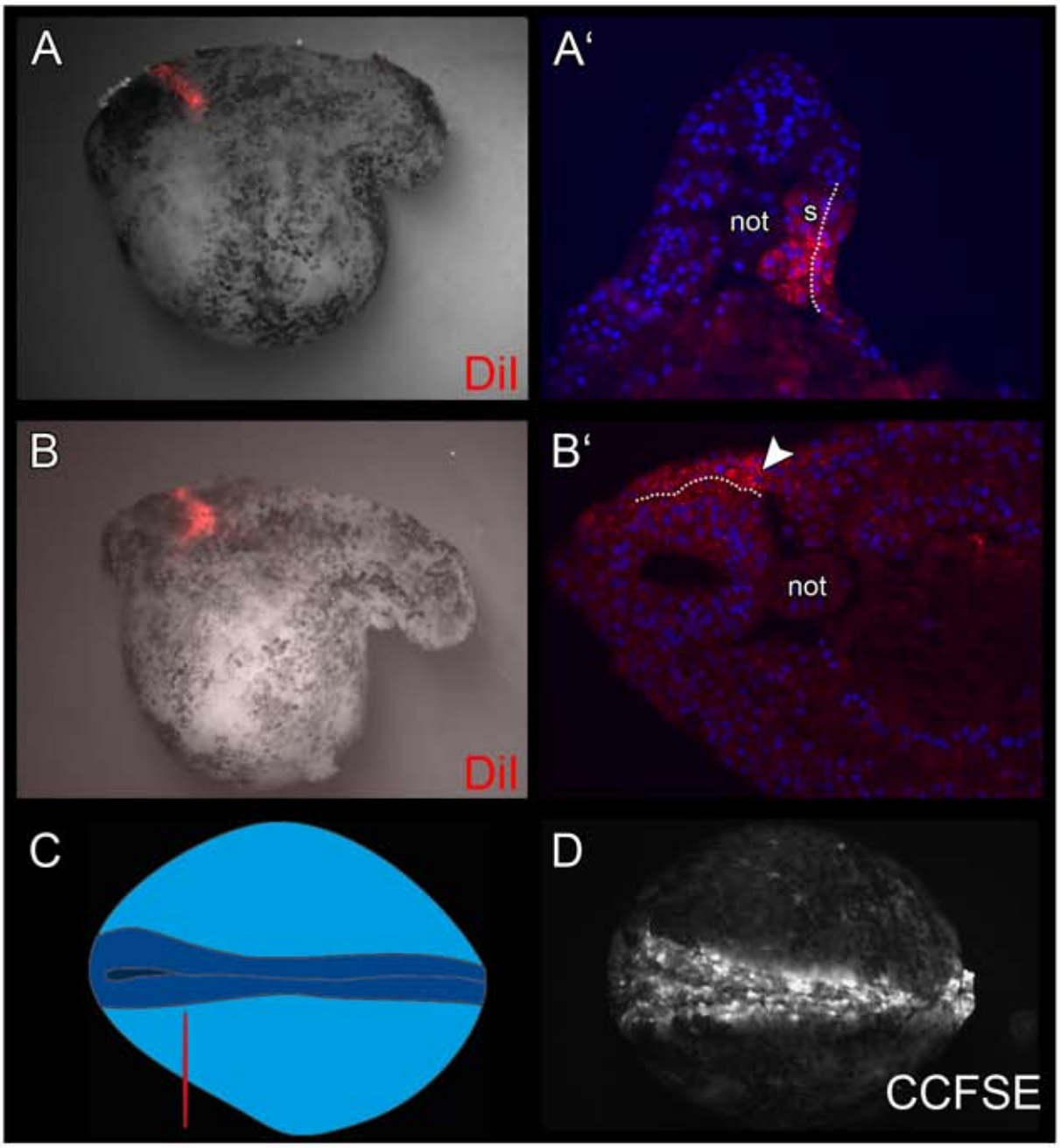
Tabulka 5: Pozdní fáze migrace hlavové neurální lišty bichira senegalského (JB-4 histologie). **(A - I)** Frontální řezy stádiem 24. **(A)** Frontální řez mandibulární oblastí na hranici mezi cementovým orgánem a optickým váčkem ve stadiu 24 s vyznačenými migrujícími buňkami trigeminálního proudu neurální lišty. **(B)** Frontální řez mandibulární oblastí s vyznačenými buňkami trigeminálního proudu neurální lišty. **(B´)** Detail předchozího řezu. **(C - D)** Frontální řez rostrální částí hyoidní oblasti s vyznačenými buňkami hyoidního proudu. **(C´)** Detail předchozího řezu. **(E – F)** Frontální řez hyoidní oblastí v místě s otickou kapsulí. **(F´)** Detailní snímek migrujících buněk hyoidního proudu nad otickou kapsulí. **(G)** Frontální řez branchiální oblastí s vyznačenými buňkami branchiálního proudu nad vyvíjejícím se prvním somitem. **(H)** Frontální řez trupovou oblastí s vyznačenými buňkami trupové neurální lišty nalézajícími se dorzálně od somitu. **(H´)** Detailní snímek předchozího řezu s důrazem na buňky trupové neurální lišty; bílá oblast značí bazální laminu vnějšího epitelu. žlutá šipka značí kontakt vnějšího epitelu s epitelem neurální trubice; zelená šipka označuje buňky hlavové neurální lišty; v rámečku SEM snímek stadia 24 **(A - H´)**.


A
optv
co
ht
St.24
B
optv
B´
St.24
C
rhom
not
C´
St.24
D
rhom
not
St.24
E
otv
not
exg
St.24
F
otv
not
F´
St.24
G
otv
not
s1
exg
St.24
H
not
s
H´
St.24

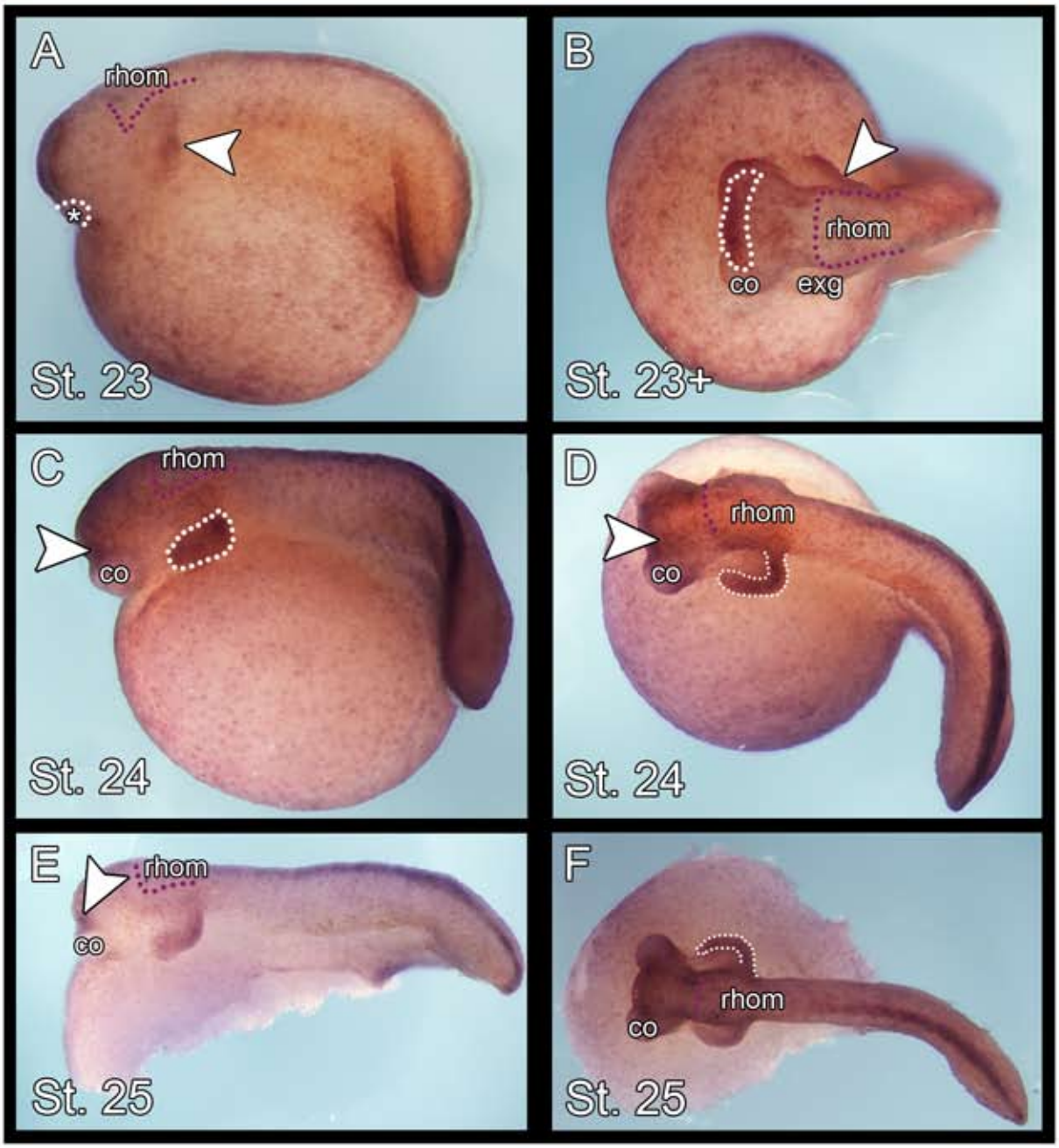
Tabulka 6: Morfogeneze v hlavové oblasti bichira senegalského, s důrazem na vizualizaci bazálních lamin jednotlivých epitelů pomocí protilátky proti fibronektinu. **(A-B´)** Frontální řezy stádiem 24. **(A)** Frontální řez hyoidní oblastí ve stadiu 24 s vyznačenými buňkami hyoidního proudu neurální lišty. **(B)** Frontální řez trupovou oblastí ve stadiu 24. V detailu **(B´)** je vidět populace trupové neurální lišty označená v předchozím snímku šipkou. **(C-D)** Horizontální řezy hlavovou oblastí ve stadiu 24. **(C)** Horizontální řez s vyznačenými buňkami trigeminálního proudu neurální lišty. Laterální expanze entodermálních buněk k povrchovému ektodermu. **(D)** Horizontální řez stadiem 24 s vyznačenými buňkami hyoidního a branchiálního proudu neurální lišty; pro lepší přehlednost bílá tečkovaná hranice vizualizuje pozici bazálních lamin.


A
H
rhom
otv
not
mmez
B
s
not
B'
pron
C
TRG
not
exg
D
H
otv
B
rhom
otv
not
s0

Tabulka 7: Mapování migrace buněk neurální lišty pomocí DiI injikací. **(A)** Injikované embryo ve stadiu 23+ s pozitivním signálem na hranici hyoidní a branchiální oblasti. **(A´)** Frontální řez předchozím embryem se pozitivním signálem v somitu a vnějším ektodermu. **(B)** Injikované embryo ve stadiu 24 s pozitivním signálem v hyoidní oblasti. **(B´)** Horizontální řez předchozím embryem s pozitivním signálem ve vnějším ektodermu a v mezodermálním mezenchymu nebo v mezenchymu původu neurální lišty. **(C)** Schéma ilustrující provedení injikace DiI. **(D)** Neurula bichira po obarvení roztokem CCFSE a pozitivním signálem v oblasti neurálních valů; Bílá tečkovaná čára značí hranice povrchového epitelu.


A
DiI
A'
not
s
B
DiI
B'
not
C
D
CCFSE

Tabulka 8: Expresní pattern genu *Dlx3* v buňkách hlavové neurální lišty bichira senegalského (ISH). **(A)** Laterální pohled na embryo ve stadiu 23 s expresním patternem genu *Dlx3* lokalizovaným v hyoidní oblasti; označeno šipkou. **(B)** Dorzální pohled na stadium 23+ s expresním patternem genu *Dlx3* v trigeminální oblasti (oblast ozačena bílou tečkovanou čárou) a expresním signálem v hyoidní oblasti (označeno šipkou). **(C)** Laterální pohled na embryo ve stadiu 24 s expresním patternem genu *Dlx3* lokalizovaným ve ventrální části primordia vnější žábry (oblast vyznačena bílou tečkovanou čárou) a v trigeminální oblasti nad cementovým orgánem (označeno šipkou). **(D)** Dorzální pohled na embryo ve stadiu 24 s expresním patternem genu *Dlx3* dorzálně od cementového orgánu (označeno šipkou) a v hyoidní oblasti s postero-ventrálním expresním patternem ve tvaru obráceného písmene L (oblast označena bílou tečkovanou čárou). **(E)** Laterální pohled na embryo ve stadiu 25 se slabším expresním patternem umístěným dorzálně od cementového orgánu (označeno šipkou) a s expresním patternem v posterio-ventrální části primordia vnější žábry, nicméně s menším rozsahem exprese než ve stadiu předchozím. **(F)** Dorzální pohled na embryo ve stadiu 25 s expresním patternem genu *Dlx3* v primordiu vnější žábry (oblast označena bílou tečkovanou čárou); Hranice rhombencephala označena fialovou tečkovanou čárou.


A
rhom
*
St. 23
B
rhom
co
exg
St. 23+
C
rhom
co
St. 24
D
rhom
co
St. 24
E
rhom
co
St. 25
F
rhom
co
St. 25

5.2. Jeseter malý (*Acipenser ruthenus*)

Jesetera malého jsem vybral do své studie jako komparativní druh, který stejně jako bichir patří mezi bazální řády paprskoploutvých ryb. Jeseter má navíc velmi zajímavý kraniofaciální fenotyp (např. výrazné rostrum), což se hodí pro studium kraniofaciální diverzity.

5.2.1. Vnější morfologie (SEM)

Pro popis vnější morfologie procesů neurulace a raného vývoje jesetera jsem jako u předchozího druhu použil skenovací elektronový mikroskop. Již na první pohled lze konstatovat, že neurulace jesetera probíhá v rámci žloutkové koule a embryo se nevyvíjí na povrchu žloutkové koule jako je tomu u bichira.

Ve stadiu 24 jsou již neurální valy vzedmuté a jejich dorzální strany se vzájemně přibližují a v některých místech se již dotýkají (Tab. 9 A). V tomto stadiu se formuje první faryngeální výchlipka, pronefros a neurální trubice se začíná rozdělovat do dvou oddílů budoucího mozku: prosencephalon a rhombencephalon (Tab. 9 A). Ve starším stadiu (st. 25) neurální valy zcela splynuly a celé embryo působí kompaktně. V tomto stadiu se také vyvíjí druhá faryngeální výchlipka (Tab. 9 B).

Ve stadiu 26 se tělo zárodku prodlužuje v anterio-posteriorním sledu a vyvíjí se u něj ocasní část těla (Tab. 9 C). V tomto stadiu u jesetera emanuje na povrch příchytný larvální orgán („cementový orgán“; o původu toho orgánu se mnoho neví, ale předpokládá se jeho vznik z entodermu) (Tab. 9 C´). V hlavové oblasti se mozek rozděluje již do třech oddílů (prosencephlaon, mesencephalon a rhombencephalon) a prolamuje se také čichový váček (Tab. 9 C´).

Ve stadiu 27 dochází k nárustu ocasní části těla, která je vidět při dorzálním pohledu na celé embryo (Tab. 9 D). V embryonálním mozku stadia 27 se v rhombencephalu diferencuje IV. mozková komora. U stadia 28 se ocasní část prodlužuje, dosahuje relativně blízko k hlavové části a je jednou tak delší než ve stadiu 27 (Tab. 9 E). U stadia 28 se oční primordium zvětšuje a je již dobře patrné, což u předchozího ještě nelze dobře rozeznat (srovnej Tab 9 D´ a E´).

5.2.2. Extirpace povrchového ektodermu a analýza pomocí SEM

Stejně jako u bichira jsem i zde použil extirpací, abych vyjevil migrační patrnost celé hlavové neurální lišty a pochopil tento pattern v kontextu vyvíjející se hlavy jesetera. Výhodou extirpací u jesetera byla velikost jeho vajíček, která je oproti bichirovi zhruba dvojnásobná.

stadium 25 bylo první, které se mi podařilo extirpovat a jsou na něm již vidět všechny tři proudy hlavové neurální lišty tak, jak je tomu u všech studovaných obratlovců. Jednotlivé migrační proudy hlavové neurální lišty jesetera jsou definovány také první a druhou faryngeální výchlipka (Tab. 10 A), které jim vytvářejí migrační koridor (srovnej Tab. 10 F). Buňky trigeminálního proudu dosahují i nejvíce anteriorní části hlavy a obcházejí emanující „cementový orgán“ (Tab. 10 B). Celistvost trigeminálního proudu je narušena rostoucím primordiem budoucího oka (Tab. 10 A, B). U embrya tohoto stáří je již pozorovatelná vyvíjející se otická plakoda, která pomáhá také lokalizovat pozici hyoidního proudu hlavové neurální lišty (Tab. 10 A).

V další vývojovém stadiu (st. 26) se migrační patrnost neurální lišty nemění (Tab. 10 C, D). V tomto stadiu se mi podařilo identifikovat poprvé pozici jednotlivých rhombomer rhombencephala. SEM snímky stadia 26 také odhalily obrovskou coelomovou dutinu (Tab. 10 D). Jako dobrý znak pro rozlišení stadia 26 od předchozího je možné použít zvětšující se faryngeální výchlipky (Tab. 10 C).

Ve stadiu 27 je počet buněk hlavové neurální lišty na dorzální straně neurální trubice v její anteriorní části menší než v předchozích stadiích (Tab. 10 E). V branchiální oblasti jsou vidět na dorzální straně rhombencephala buňky prodělávající epitelo-mezenchymální přechod (Tab. 10 F, H). Poprvé je možno v tomto stadiu pozorovat velké počty buněk trupové neurální lišty, které jsou vidět na dorzální straně somitů (Tab. 10 E, F). Dále se mi poprvé podařilo identifikovat nervová ganglia (Tab. 10 E; označen rozsah šipkami) a také v anteriorní části pod neurální trubicí jsou pozorovatelné laterální výběžky přední části vyvíjejícího se embryonálního střeva (Tab. 10 E). Díky selektivní extirpaci buněk hyoidní proudu je dobře vidět migrační koridor, který je utvářen první a druhou faryngeální výchlipkou a utváří jím jedinou možnou migrační cestu (Tab. 10 F).

Ve stadiu 28 jsou buňky hlavové neurální lišty přítomny laterálně od neurální

trubice. Jediným pozůstatkem hlavové neurální lišty na dorzální straně embryonálního mozku jsou buňky nacházející se okolo pineálního orgánu (Tab. 10 G). V mandibulární oblasti je ve stadiu 28 vidět prominující mandibulární hlavová kavita a dorzálně od ní lze identifikovat neurální ganglium (Tab. 10 G). Další neurální ganglium se utváří posteriorně od otické kapsule (Tab. 10 G). Starší embrya se nezdařila dobře extirpovat, protože hlavová oblast jesetera je velmi komplikována přítomností např. čichových váčků, emanujícími hlavovými kavitami apod.

Obecně lze konstatovat, že hlavová neurální lišta jesetera malého působí dosti kompaktně oproti bichirovi a také že jednotlivé migrační proudy velikostně odpovídají informacím získaným z ostatních studovaných druhů (až na bichira, viz Tab. 2).

5.2.3. Histologická analýza (JB-4 pryskyřice)

Na histologických řezech jsem se pokusil popsat první známku emigrace hlavové neurální lišty jesetera. Přestože se histologické zpracování tkání jesetera ukázalo jako technicky velice složité z důvodu přítomnosti hlavových kavit apod, i tak se mi podařilo identifikovat emigraci neurální lišty a pozdní fázi migrace hlavové neurální lišty na histologických řezech.

První emigrující buňky hlavové neurální lišty jsem identifikoval ve stadiu 23 (Tab. 11 A-C). Frontální řez zcela anteriorní částí mandibulární oblasti, který ukazuje zvednuté a dosud nespojené neurální valy, neobsahuje žádné patrné migrující buňky neurální lišty (Tab. 11 A, A´). Hned na dalších, více posteriorně umístěných řezech jsem však identifikoval první migrující buňky hlavové neurální lišty v mandibulární oblasti (Tab. 11 B, B´). Na detailním snímku vrcholu neurálního valu jsou patrné emigrující buňky, kterým ektodermální epitel uvolňuje prostor pro migraci (Tab. 11 B´). Na dorzální straně, laterálně od neurálních valů je vidět několikavrstevný ektoderm, jehož destičkovité zluštění je nejasného určení (Tab. 11 B´ a C; označeno šipkou). Na frontálním řezu budoucí hyoidní oblastí už nejsou patrné žádné buňky neurální lišty (Tab. 11 C).

Pozdní fázi migrace neurální lišty jsem analyzoval na embryu ve stadiu 27 (Tab. 12 A-F). V tomto stadiu lze buňky hlavové neurální lišty rozlišit i podle

barevného odstínu, čehož se ve velmi raných stadiích nepodařilo dosáhnout.

Na frontálním řezu mandibulární oblastí v místě budoucího oka jsou vidět buňky trigeminálního proudu migrující z dorzální strany rhombencephala, přes primordium oka a nacházející se v tenkém migračním pruhu buněk (Tab. 12 A). Na tomto řezu lze pozorovat cévy laterálně a ventrálně umístěné od embryonálního mozku (Tab. 12 A; označeny hvězdičkou). Na ventrální straně tohoto řezu se nachází „cementový orgán“, který má typickou stavbu se sekretujícími buňkami (Tab. 12 A).

Na dalším řezu jsou už vidět buňky trigeminálního i hyoidního proudu, které jsou od sebe rozděleny první faryngeální výchlipkou (Tab. 12 B). Ve stejném řezu jsou rozpoznatelené hlavové kavity, konkrétně kavita premandibulární umístěná více mediálně, a kavita mandibulární ležící laterálně od premandibulární (Tab. 12 B). Na ventrální straně je také možno identifikovat vyvíjející se srdce (Tab. 12 B). Další frontální řez ukazuje řez vyvíjejícím se hyoidním obloukem, kde buňky hyoidní proudu neurální lišty obkružují mezodermální mezenchymatické jádro (Tab. 12 C).

Frontální řez hyoidní oblastí ukazuje jak vyvíjející se embryo jesetera sedí na „stopce“ entodermu, která slouží k vyživování embrya. Na tomto řezu lze identifikovat neurální ganglium umístěné mediálně od otické kapsule a také je dobře viditelná coelomová dutina (Tab. 12 D). Na řezu branchiální oblastí jsou patrné migrující buňky branchiální proudu neurální lišty a lze rozpoznat anteriorní část prvního somitu (Tab. 12 E). Poslední frontální řez je veden trupovou oblastí, kde lze pozorovat somity a zvětšující se notochord (Tab. 12 F), ale buňky trupové neurální lišty zde nelze dobře odlišit.

5.2.4. Imunohistochemie

Pro další ověření migrační patrnosti hlavové neurální lišty jsem použil imunohistochemického značení pomocí klasického markeru neurální lišty HNK-1, který se také kromě značení buněk neurální lišty používá ke značení nervů.

HNK-1 protilátku s navázaným biotinem jsem použil ve stadiích 23-28. Jedinými stadii s pozitivním signálem jsou stadia 27 a 28, u mladších stadií je také vidět signál, ale tento signál je nespecifický a zdá se navíc, že protilátka s biotinem uvízla v různých typech dutin, jako např. v otických kapsulích apod. Namísto

identifikací buněk neurální lišty se tedy zdá, že protilátka HNK-1 se váže na vznikající hlavové nervy. Ve stadiu 27 jsem pomocí HNK-1 vizualizoval V. hlavový nerv (*n. trigeminus*), VII. hlavový nerv (*n. facialis*) a IX. hlavový nerv (*n. Glossopharyngeus*) (Tab. 13 A´). V tomto stadiu je také možno identifikovat tzv. Rohon-Beardovy buňky v trupové části těla (Tab. 13 A´).

. Vyzkoušel jsem stejně jako u bichira protilátku proti fibronektinu, která by mi pomohla detekovat přesnou pozici bazálních lamin jednotlivých epitelů. Jak již však bylo řečeno výše, zpracování embryonálního materiálu jesetera na řezech je velmi komplikované, a použil jsem jedinou vhodnou techniku na imunohistochemické značení, vibratomové řezy. Nicméně protilátka proti fibronektinu u jesetera nefungovala a pozitivní signál nebyl dokonce detekován ani v trupové oblasti, kde standardně tato protilátka funguje.

Komplikací pro imunohistochemické značení jesetera je také zpracování jeho tkání na řezech, neboť jeseteří materiál nelze zpracovat v kryostatu, kde se jeho žloutkem bohaté tkáně v zalévacích mediích trhají, ani na vibratomu, kde vypadávají z agarového bločku.

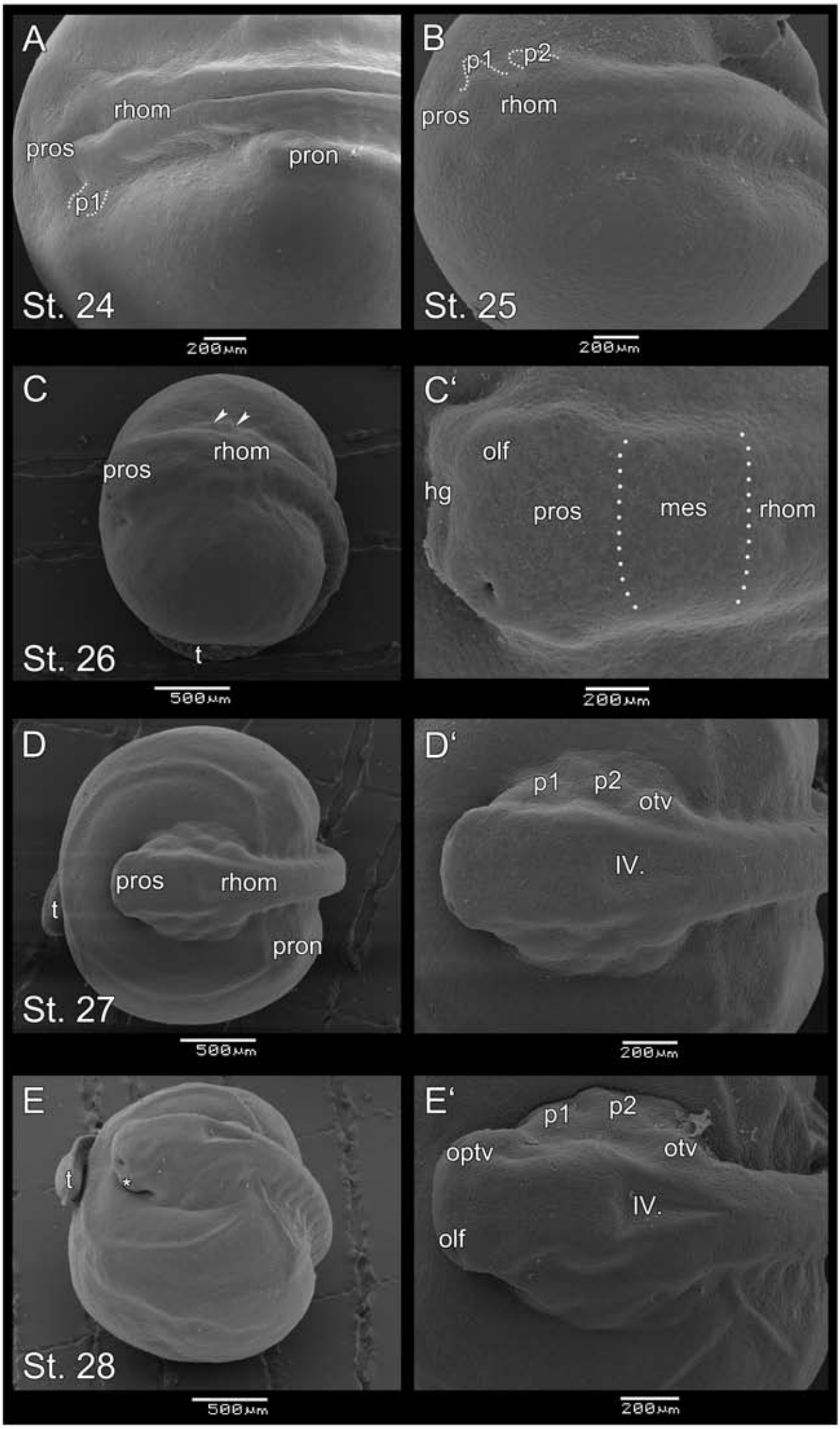
5.2.5. Vitální barvení lipofilním markerem DiI

Pomocí injikací lipofilního markeru jsem chtěl přesně vizualizovat migrační patrnost jednotlivých migračních proudů hlavové neurální lišty. Injikace jsem prováděl do neurálních valů ve stadiu 23 a 24. Celkem jsem nainjikoval 120 embryí, z čehož však 15 mělo pozitivní signál, ale pouze u 5 jsem identifikoval signál v buňkách neurální lišty (kupř. Tab. 13 B, C). Takto injikována embrya byla ponechána v E2 médiu až do kýženeho vývojového stadia, kdy dle znalostí z předchozích analýz byly buňky neurální lišty v příslušné fázi migrace. Z pozitivně injikovaných vzorků se ukázalo, že injikaci jsem provedl poměrně posteriorně a byly tak označeny pouze buňky hyoidního a branchiálního proudu (Tab. 13 B, C). Nicméně získaný signál odpovídá informacím získaným z extirpačních experimentů (srovnej Tab. 10 E, F). Pro potvrzení injikačních experimentů jsem se pokusil injikovaná embrya nařezat a obarvit pomocí DAPI (na vizualizaci buněčných jader) a protilátkou proti fibronektinu. Nicméně problém se zpracováním embryí na řezech se ukázal jako

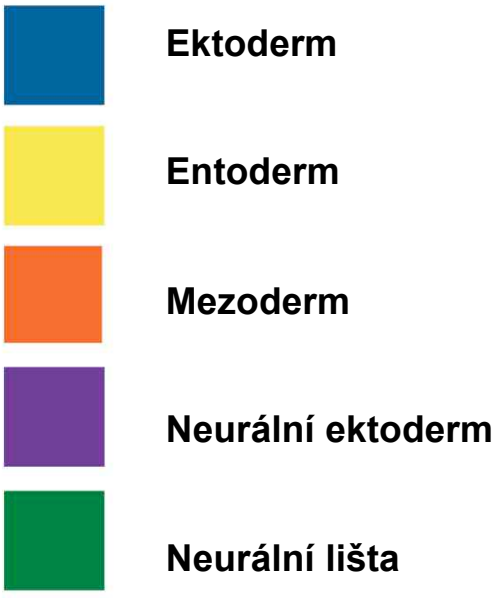
zásadní a získané řezy nebyly tak kvalitní, aby v nich mohl být pozorován pozitivní signál DiI.

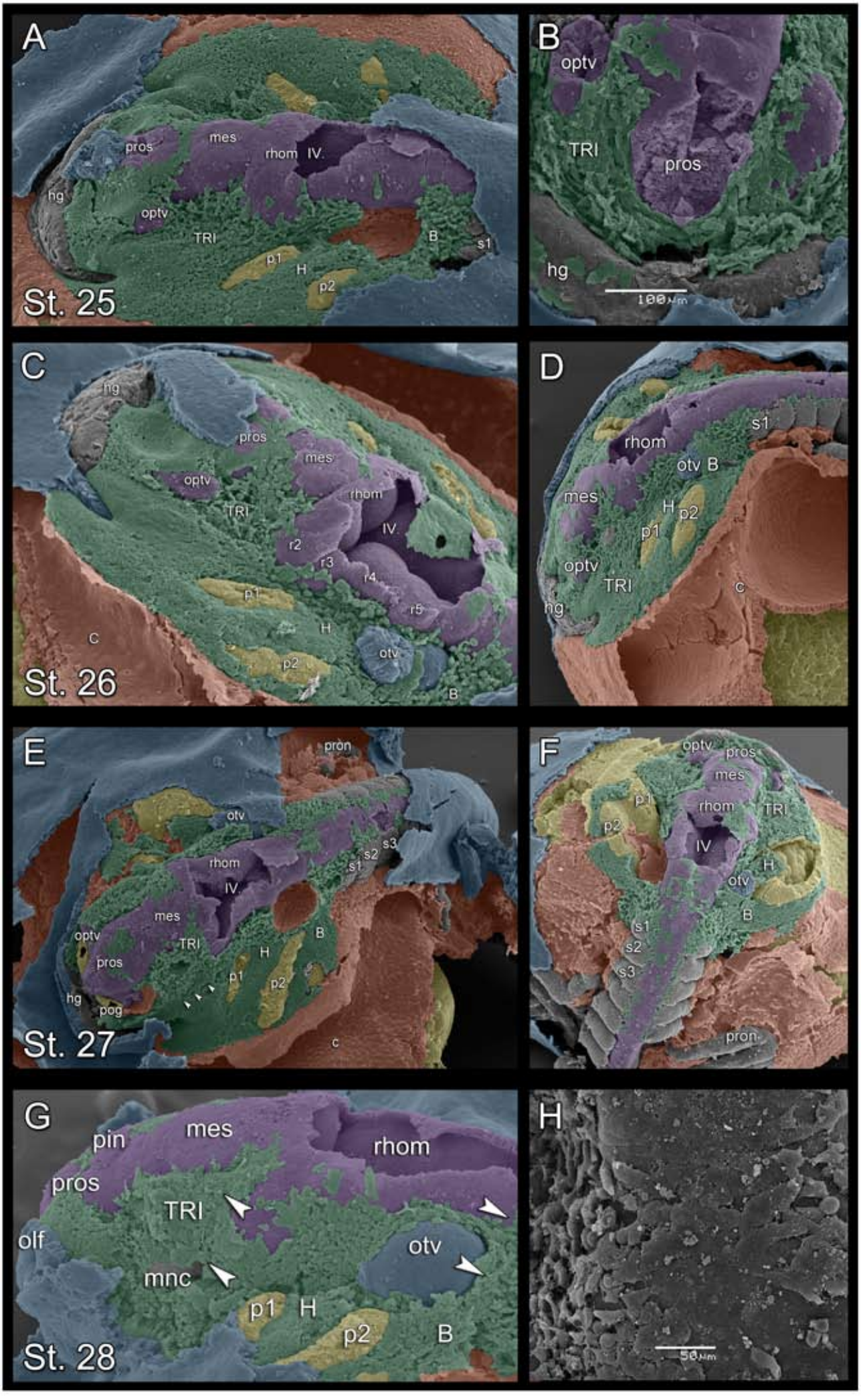
Na embryonálním materiálu jesetera jsem se také pokusil použit značení pomocí CCFSE. Nicméně tato látka se ukázala pro jesetera velmi toxická a způsobila okamžité úmrtí embrya, které se projevilo protržením žloutku.

Tabulka 9: Raný vývoj jesetera malého *Acipenser ruthenus* (SEM). **(A - D)** Dorzální pohled na jednotlivá stadia od pozdní fáze neurulace až po stadium rané larvy. **(C´ - D´)** Detailní pohledy na hlavovou oblast stadia 26 – 28.

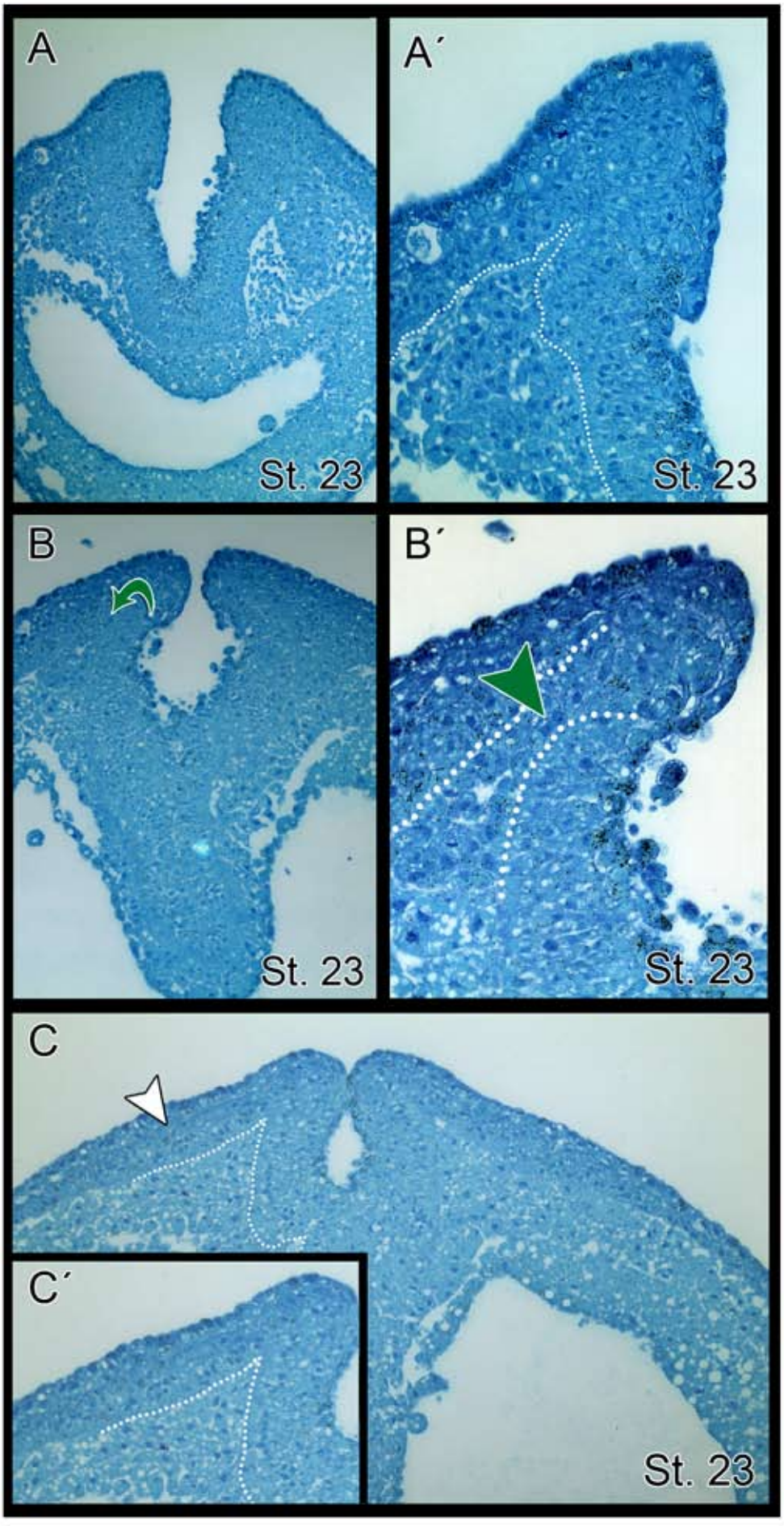

A
rhom
pros
pron
p1
St. 24
200µm
B
p1
p2
pros
rhom
St. 25
200µm
C
rhom
pros
t
St. 26
500µm
C‘
olf
hg
pros
mes
rhom
200µm
D
pros
rhom
t
pron
St. 27
500µm
D‘
p1
p2
otv
IV.
200µm
E
t
*
St. 28
500µm
E‘
p1
p2
optv
otv
IV.
olf
200µm

Tabulka 10: Migrace hlavové neurální lišty jesetera malého (Extirpace a SEM analýza). **(A)** Dorzální pohled na jednotlivé migrační proudy hlavové neurální lišty ve stadiu 25 **(B)** Detailní pohled na anteriorní část hlavové oblasti s vyznačeným trigeminálním proudem hlavové neurální lišty ve stadiu 25; Hlava směřuje dolů **(C)** Dorzální pohled na jednotlivé migrační proudy hlavové neurální lišty ve stadiu 26. **(D)** Laterální pohled na migrační proudy hlavové neurální lišty ve stadiu 26.**(E-F)** Dorzální pohled na embryo ve stadiu 27 se všemi migračními proudy hlavové neurální lišty a na vyznačené buňky trupové neurální lišty. **(G)** Laterální pohled na migrační proudy hlavové neurální lišty ve stadiu 28. **(H)** Detailní pohled na epitelo-mezenchymální přechod; šipky označují vznikající neurální ganglia.

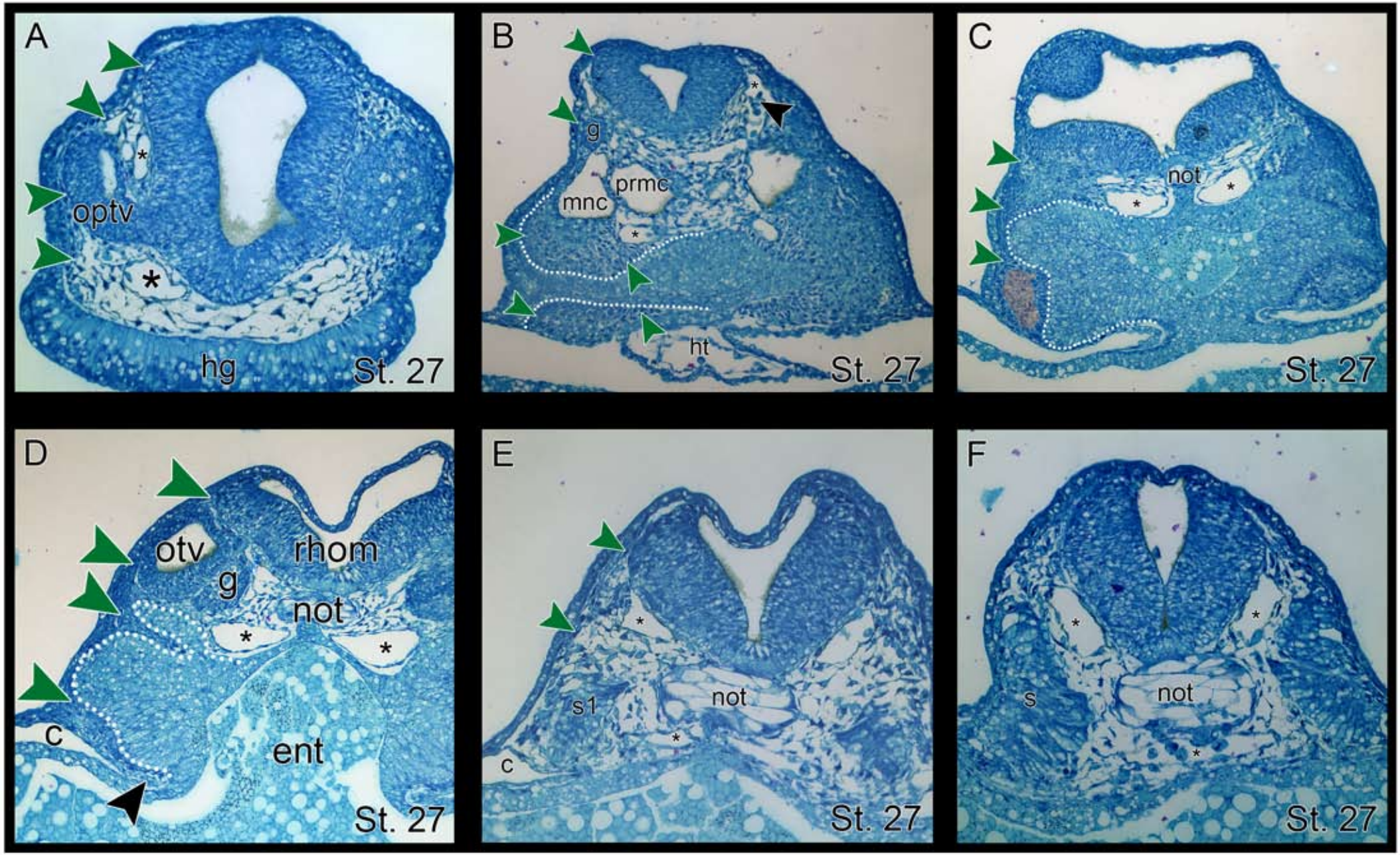



A
pros
mes
rhom
IV
hg
optv
TRI
B
s1
p1
H
p2
St. 25
B
optv
TRI
pros
hg
100µm
C
hg
pros
mes
optv
rhom
TRI
IV
r2
r3
r4
r5
p1
H
C
otv
p2
B
St. 26
D
s1
rhom
otv B
mes
H
p2
p1
optv
TRI
C
hg
E
pron
otv
s3
s2
s1
rhom
IV
mes
optv
TRI
B
H
pros
p1
p2
hg
pog
c
St. 27
F
optv
pros
mes
p1
rhom
TRI
p2
IV
H
otv
B
s1
s2
s3
pron
G
pin
mes
rhom
pros
TRI
olf
otv
mnc
p1
H
p2
B
St. 28
H
50µm

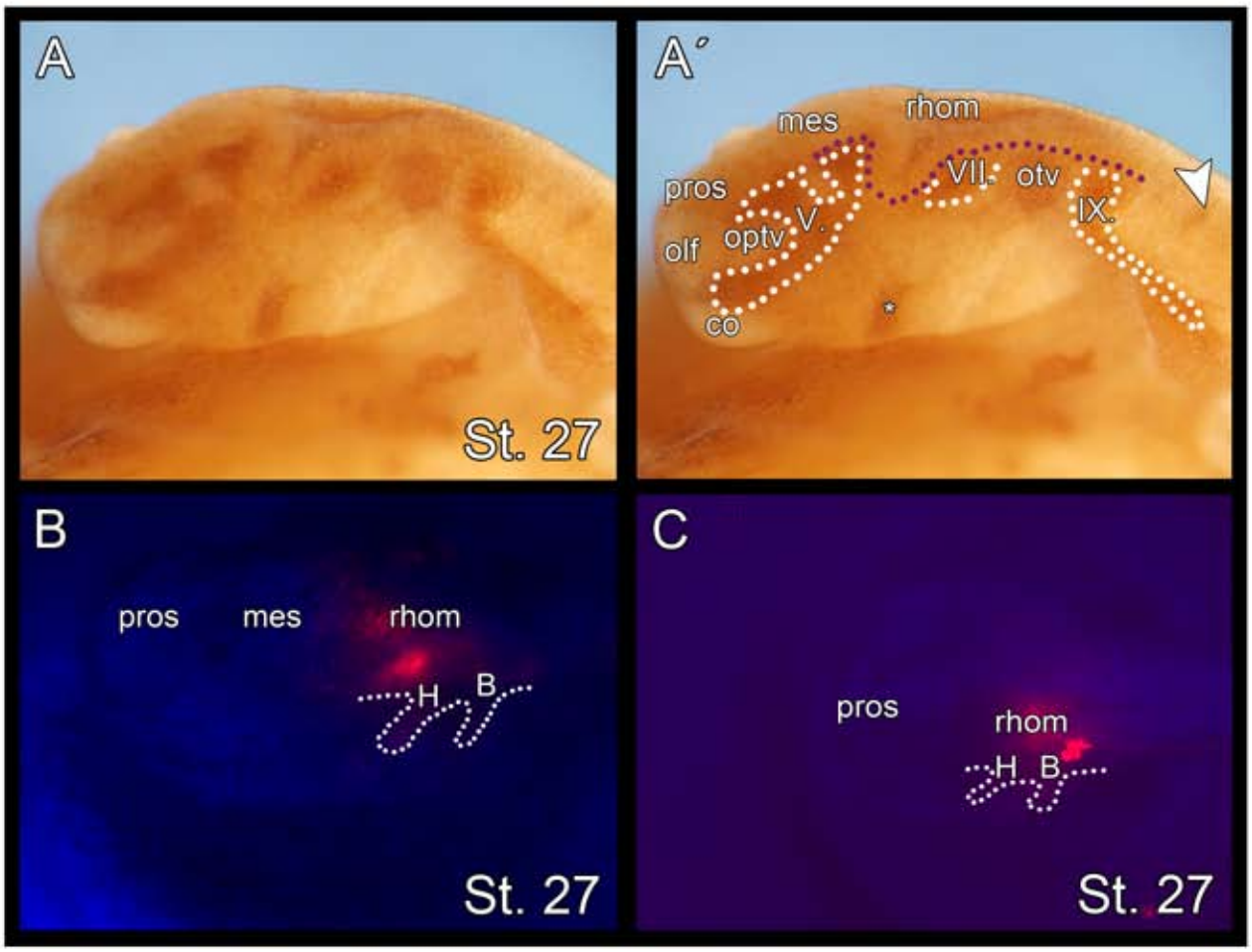
Tabulka 11: Vznik neurální lišty jesetera malého (JB-4 histologie). **(A - C)** Frontální řezy stádiem 23. **(A)** Frontální řez nejvíce anteriorní částí mandibulární oblasti. **(A´)** Detailní snímek předchozího řezu zachycující dorzální část neurálního valu s vyznačenou bazální laminou (bílá tečkovaná čára) povrchového ektodermu. **(B)** Frontální řez posteriorně umístěný od předchozího (A) s vyznačenou emigrací buněk trigeminálního proudu hlavové neurální lišty (označeny zelenou šipkou). **(B´)** Detailní snímek dorzální části neurálního valu předchozího řezu s vyznačenou pozicí bazální laminy (bílá tečkovaná čára) povrchového ektodermu. **(C)** Frontální řez hyoidní oblastí s vyznačenou pozicí bazální laminy povrchového ektodermu (bílá tečkovaná čára) a s označením několikavrstevného ztluštění povrchového ektodermu umístěného laterálně od vrcholku neurálního valu (označeno šipkou). **(C´)** Detail ztluštěného povrchového ektodermu


A
St. 23
A´
St. 23
B
St. 23
B´
St. 23
C
C´
St. 23

Tabulka 12: Pozdní fáze migrace hlavové neurální lišty u jesetera malého (JB-4 histologie). **(A – F)** Frontální řezy stadiem 27. **(A)** Frontální řez mandibulární oblastí v místě otického váčku s vyznačenými buňkami trigeminálního proudu. **(B)** Frontální řez posteriorní částí mandibulární oblasti s vyznačenými buňkami trigeminálního proudu neurální lišty a evaginujícím entodermem. **(C)** Frontální řez vznikajícím hyoidním obloukem, který utvářejí buňky hyoidního proudu a obklopují mezodermální jádro. **(D)** Frontální řez hyoidní oblastí s vyznačenými buňkami hyoidního proudu neurální lišty. Řez také zachycuje entodermální stopku, na které embryo sedí a slouží mu k vyživování. **(E)** Frontální řez branchiální oblastí zachycující migrující buňky branchiálního proudu a vznikající první somit. **(F)** Frontální řez trupovou oblastí; zelené šipky značí migrující buňky hlavové neurální lišty; hvězdička označuje cévy; černá šipka poukazuje na erytrocyty


A
optv
hg
St. 27
B
g
prmc
mnc
ht
St. 27
C
not
St. 27
D
otv
rhom
g
not
c
ent
St. 27
E
s1
not
c
St. 27
F
s
not
St. 27

Tabulka 13: Mapování migrace neurální lišty jesetera pomocí HNK-1 protilátky a DiI injikací. **(A)** Laterální pohled na hlavovou část embrya ve stadiu 27 bez pomocné vizualizace detekovaného signálu. **(A´)** Pomocné schéma identifikující jednotlivé signály HNK-1 protilátky; Bílá tečkovaná čára značí rozsah hlavových nervů; šipka označuje signál v Rohonbeardových buňkách; hvězdička označuje blíže neurčený signál. **(B - C)** Dorzo-laterální pohled na migrující buňky hyoidního a branchiálního proudu označeného pomocí DiI markeru; bílá tečkovaná čára označuje rozsah označených proudů za pomoci DiI.


A
St. 27
A´
mes
rhom
pros
VII.
otv
V.
IX.
olf
optv
co
B
pros
mes
rhom
H
B
St. 27
C
pros
rhom
H
B
St. 27

6. Diskuze

6.1. Migrace hlavové neurální lišty u dvou nejbazálnějších zástupců paprskoploutvých ryb

Bichir je dnes považován za zástupce nejbazálnějších paprskoploutvých ryb (Inoue *et* al., 2004; Gardiner *et* al., 2005), ovšem dříve byl zařazován i mezi svaloploutvé ryby (Sarcopterygii) a byl chápán jako pojítko mezi obojživelníky a paprskoplouvými rybami (kupř. Kerr, 1903; Goodrich, 1958). Jeseter stejně jako bichir patří mezi bazální paprskoploutvé ryby a má stejně jako bichir spoustu společných pleziomorfních znaků (např. ganoidní šupiny, zachované spirakulum apod.). Bichir a jeseter se tedy nacházejí blízko větvení paprskoploutvých a svaloploutvých ryb a díky své pozici jsou bichiři a jeseteři považováni za ideální druhy pro komparativní studie a pro pochopení evoluce znaků ve skupině paprskoploutvých ryb, ale také znaků v rané evoluci tetrapod (kupř. Bartsch *et* al., 1997; Hall, 2001).

Raný embryonální vývoj bichira a jesetera připomíná spíše vývoj obojživelníků než vývoj paprskoploutvých ryb, což je dobře vidět i např. na gastrulaci obou druhů, která připomíná gastrulaci drápatky (Bolker, 1993; Takeuchi *et* al., 2009). Také neurulace obou druhů je rozdílná oproti neurulaci u paprskoploutvých ryb, neboť oba druhy prodělávají tzv. primární neurulaci a vytvářejí tedy neurální trubici invaginací ektodermu (Tab. 3). Naproti tomu neurulace u paprskoploutvých ryb (sekundární neurulace) probíhá většinou přes tzv. neurální kýl a neurální trubice vzniká kavitací (Papan & Campos-Ortega; 1994). Oba mnou studované druhy se však také v mnohém liší: embryo bichira se vyvíjí na povrchu žloutké koule, zatímco vývoj jesetera probíhá v rámci žloutkové koule, což možná souvisí s vnitřním uspořádáním celého vajíčka, protože embryo jesetera sedí na masivní entodermální stopce a zbytek embrya je obklopen obrovskou coelomovou dutinou (srovnej bichir: Tab. 1, 2 a jeseter: Tab. 9, 10) .

6.1.1. Vznik hlavové neurální lišty u bichira a jesetera

Ke vzniku neurální lišty dochází během formování neurální trubice (Le Douarin & Kalcheim, 1999; Hall, 2009). Já jsem u bichira i jesetera pozoroval velmi ranou emigraci buněk hlavové neurální lišty, neboť tyto buňky u obou druhů začínají migrovat ještě před splynutím neurálních valů (Tab. 3 a Tab. 11), zatímco u většiny studovaných obratlovců dochází k odmigrovávání buněk hlavové neurální lišty až po úplném splynutí neurálních valů, jak je vidět kupř. u ptáků (Tosney, 1982; Noden, 1988; Tokita, 2006), plazů (Kundrát, 2009), některých obojživelníků (čolek: Jacobson & Meier, 1984; axolotl: Falck *et* al., 2002; Mitgutsch *et* al., 2008), bahníka (Falck *et* al., 2000; Ericsson *et* al., 2008) a mihulí (Horigome *et* al., 1999). U některých druhů nicméně dochází stejně jako u mnou studovaných druhů k emigraci buněk hlavové neurální lišty ve stadiích s otevřenou neurální trubicí: takto tomu je u některých obojživelníků (skokan japonský: Ichikawa, 1937; drápatka: Sadaghiani & Thiébaud, 1987; bezblanka: Moury & Hanken, 1995; kuňka východní: Olsson & Hanken, 1996; vakorosnička: del Pino & Medina, 1998; skokan hnědý: Mitgutsch *et* al., 2008), či savců (krysa: Tan & Morris-Kay, 1985; 1986; vačice: Smith, 2001). Jelikož paprskoploutvé ryby prodělávají jiný typ neurulace než ostatní obratlovci, tak lze jen velmi obtížně srovnávat emigraci buněk hlavové neurální lišty, protože u paprskoploutvých ryb nelze mluvit o otevřené či uzavřené neurální trubici.

Nabízí se samozřejmě otázka, co mají společného ty druhy, u kterých dochází k emigraci buněk hlavové neurální lišty ještě před uzavřením neurální trubice, tedy dříve, než je klasicky očekáváno (Le Douarin & Kalcheim, 1999; Hall, 2009). Na tuto otázku nejde jednoznačně odpovědět, neboť se jedná o velmi rozličné druhy. Zajímavé však je, že kupříkladu u téměř všech žab (většina skokanů, drápatka, kuňka, žáby s přímým vývojem: vakorosnička, bezblanka dochází k emigraci z otevřené neurální trubice a například u skonana černobokého migrují buňky hlavové neurální lišty až z uzavřené neurální trubice (Mitgtutsch *et.* al., 2008) i přes to, že mají například velmi podobný typ vajíček (tvarově) a migrační patrnost hlavové neurální lišty je u všech žab naprosto stejná a nelze identifikovat žádné rozdíly.

Paprskoploutvé ryby navíc prodělávají odlišný typ neurulace, než ostatní obratlovci, nelze zde mluvit o otevřené či zavřené neurální trubici, a je tedy poměrně obtížné provádět přímá srovnání. Je nicméně zřejmé, že buňky neurální lišty pro svou indukci či emigraci z povrchu epitelů neurální trubice nepotřebují splynutí a tedy dotknutí se vrcholků neurálních valů, jak se klasicky uvádělo, neboť u mnoha druhů začínají buňky neurální lišty migrovat drive, než k tomuto dojde (většina skokanů, kuňka, žáby s přímým vývojem, myš, krysa, vačice). Obecně lze asi soudit, že je výhodné, aby buňky neurální lišty odmigrovaly co nejdříve a tedy v co nejranějším stadiu, a zapojili se do morfogeneze těla ještě během neurulačních procesů. Asi nejvíce extrémní případ představují vačice (*Monodelphis sp.)*, kde dochází k emigraci buněk hlavové neurální lišty ještě na úrovni nediferencované ploténky, což umožní, že se této vačici diferencují skeletální a svalové struktury orálního aparátu velmi raně. Tato vývojová heterochronie má ekologicko-evoluční dopad, protože umožňuje nedovyvinutému mláděti vačice dostat se vlastními silami do matčina vaku.

6.1.2. Heterochronie v emigraci hyoidního proudu hlavové neurální lišty bichira senegalského

Vznik neurální lišty bichira, jak již bylo řečeno, je velmi časný. U bichira jsem identifikoval, že jako první odmigrovávají buňky hyoidního proudu neurální lišty a to z dorzální strany neurálních valů (Tab. 3), což je naprosto unikátní nález, který dosud nebyl u jiného studovaného obratlovce nalezen. Hyoidní emigrující proud jsem identifikoval ve stadiu, kdy se teprve dochází k formování neurálních valů (Tab. 3 B, B´) a ani v následujícím stadiu nebyl zaznamenán další emigrující proud hlavové neurální lišty (Tab. 3 D – F). Tuto situaci lze tedy popsat jako výraznou heterotopii (hyoidní proud migruje časněji oproti zbývajícím hlavovým proudům) a heterotopii (hyoidní proud osidluje oblast okolo faryngu jako první) v emigraci hyoidního proudu hlavové neurální lišty bichira.

U obratlovců platí obecné pravidlo, že hlavové tkáně se vyvíjejí v předozadním směru a tak i v obecném schematu migrace hlavové neurální lišty jsou to buňky trigeminálního proudu, které migrují první (kupř. Cerny *et* al., 2004) a zajímavé je, že toto platí i druhů, u kterých dochází k emigraci z otevřené neurální

trubice (kupř. Mitgutsch *et* al., 2008). Jedinou nalezenou změnou v emigrační posloupnosti jednotlivých migračních proudů hlavové neurální lišty, kterou jsem v literatuře dokázal nalézt, je nediskutovaná zmínka o ranější emigraci branchiálního proudu hlavové neurální lišty oproti hyoidnímu proudu u krysy (Tan & Morriss-Kay, 1985).

Velmi raná emigrace buněk hyoidního proudu hlavové neurální lišty zřejmě souvisí s časným vývojem hyoidního oblouku, na kterém u bichira vznikají vnější žábry. Vnější žábry slouží larvám obojživelníků (žáby, mloci a červoři), bahníků (*Protopteus, Lepidosiren* ale ne u *Neoceratoda*) a také bichirů k dýchání, nicméně standardně se nacházejí na obloucích branchiálních. Vnější žábry představují zjevnou ekologickou adaptaci k podmínkám s menším obsahem kyslíku a musí tedy existovat silný ekologický tlak na raný vývoj žaber. Protože vnější žábry bichira se nacházejí na hyoidním oblouku, je očekávatelné, že se právě taková heterochronie v migraci hyoidního proudu bichira objeví. Časný vývoj primordia vnějších žaber bichira je patrný už z vnější morfologie bichira ve velice raných stadiích (Tab. 1), nicméně jejich vývoj je komplikovanější v tom, že se do něj zapojuje ještě evaginující entoderm (Crkvová, 2012).

Z výše řečeného je možné očekávat, že druhy s vnějšími žábrami na branchiálních obloucích budou mít obdobnou heterochronickou adaptaci ve smyslu ranější či výraznější migrace branchiálního proudu, ovšem žádná obdobná zmínka v literatuře dosud neexistuje.

6.1.3. Migrační patrnost hlavové neurální lišty u bichira a jesetera

Pro kompletní vyjevení migrace hlavové neurální lišty jsem využil extirpací povrchového ektodermu a následné analýzy skenovací elektronovou mikroskopií. Extirpace povrchové ektodermu byla použita v několika klasických pracech, protože umožňuje dobře vizualizovat kompletní migraci hlavové neurální lišty v kontextu vyvíjející se hlavy (kupř. Horigome *et* al., 1999; Falck *et* al., 2000; Cerny *et* al., 2004; Mitgutsch *et* al., 2008).

Buňky trigeminálního proudu emigrují u bichira nejdříve jen z nejvíce anteriorní části prosencephala a teprve v pozdějších fázích vývoje dochází k

migraci také z posteriorní části prosencephala (Tab. 2 a Tab. 8). Velmi podobná situace je pozorovatelná i u buněk trigeminálního proudu jesetera (Tab. 10). U obou mnou studovaných druhů však z nejvíce posteriorní části prosencephala k emigraci buněk trigeminálního proudu, protože se v této oblasti vyvíjí pineální orgán (Tab. 2 G a Tab. 10 G), který se diferencuje z diencephala předního mozku (kupř. zebřička: Liang *et* al., 2000). Také u jiných druhů z prosencephala odmigrovává jen velmi malé množství buněk trigeminálního proudu (kupř. Kuratani *et* al., 1999, ale například u kuřete (Johnston, 1966; Noden, 1975) a krysy (Tan & Morriss-Kay, 1985) není migrace buněk trigeminálního proudu z prosencephala známa; u myši je však příspěvek buněk z prosencephala poměrně značný a dobře prozkoumaný (Serbedzija *et* al., 1992; Osumi-Yamashita *et* al., 1994).

Zajímavá situace u obou mnou studovaných druhů je v oblasti mesencephala odkud nemigrují žádné buňky neurální lišty, které by přispívaly do trigeminálního proudu (bichir: Tab. 2, Tab. 8 a jeseter: Tab. 10). U všech studovaných druhů obratlovců však standardně z této oblasti odmigrovávají buňky trigeminálního proudu neurální lišty (kupř. Osumi-Yamashita *et* al., 1994; Kuratani *et* al, 1999). V mesencephalu se však může nacházet tzv. “neural crest-free zone”, tedy oblast bez buněk neurální lišty, odkud tyto buňky nemigrují (kupř. Cerny *et* al., 2004 a citace tam). Z mých dosavadních dat však dosud nejsem schopen podat bližší informace o rozsahu této oblasti: v budoucnu by se hodilo například provést hybridizace genu *AP-2* či *Snail*, které by mohly pomoci rozklíčovat tuto otázku.

Hyoidní proud je u bichira nejmasivnějším proudem a předčí tak svou velikostí i trigeminální proud, který je u všech studovaných obratlovců největší (kupř. Le Douarin & Kalcheim, 1999; Kulesa *et* al., 2004). Naproti tomu hyoidní proud hlavové neurální lišty jesetera dodržuje obecnou migrační posloupnost a také svou velikostí odpovídá obecnému migračnímu schématu, protože je ze všech tří hlavových migračních proudů nejmenší (Tab. 10 srovnej s kupř. Cerny *et* al., 2004). Hyoidní proud na svém distální konci u jesetera kontaktuje buňky jak trigeminálního, tak branchiálního proudu (Tab. 10). Otázkou je, zda-li zde dochází k míšení mezenchymatických buněk jednotlivých proudů, což pouze ze skenovací elektronové mikroskopie nelze říci, a proto by bylo vhodné zkusit zjistit tuto situaci např. pomocí DiI injikací jen do hyoidního proudu a poté vizualizovat pozici jednotlivých označených buněk. Buňky hyoidního proudu neurální lišty migrují ve

standardní migrační patrnosti z rhombomery 4 (kupř. Köntges & Lumsden, 1996), kterou lze vidět dobře i u jesetera (Tab. 10 C), naproti tomu u bichira tuto rhombomeru nejsem schopen detekovat.

Branchiální proud u bichira i jesetera začíná odmigrovávat až jako poslední z hlavových migračních proudů neurální lišty (Tab. 4 I, Tab. 5 G, Tab. 13 B-C). Branchiální migrační proud bichira je velikostně výrazně omezen dominantním hyoidním proudem, který zabírá velkou většinu prostoru a tlačí buňky branchiálního proudu na vznikající somity (Tab. 2 E). Branchiální proud v obecném migračním schématu vzniká za otickou kapsulí (kupř. Cerny *et* al., 2004). U zebřičky, drápatky a myši je branchiální proud tvořen buňkami vznikajícími z rhombomer 5 a 6 a u kuřete je tvořen buňkami vznikajícím z rhombomer 6 a 7 (Sadaghiani & Thiebaud, 1987; Osumi-Yamashita *et* al., 1994; Schilling & Kimmel, 1994; Trainor & Tam, 1995; Kontges & Lumsden, 1996). U mnou získaných dat nejsem schopen říci, ze kterých rhombomer buňky branchiálního proudu bichira i jesetera vznikají, proto bych navrhoval pokusit se přesně detekovat pozici rhombomery 5 pomocí *in situ* hybridizací genu *krox20*, který je specificky exprimován v rhombomeře 3 a 5 (Wilkinson *et* al., 1989).

6.1.4. Trigeminální proud hlavové neurální lišty u bichira a jesetera

Jak již bylo řečeno v předchozí podkapitole, buňky trigeminálního proudu hlavové neurální lišty migrují z anteriorní části prosencephala u bichira i jesetera. Jak ukazuje expresní analýza genu *Dlx3* (Tab. 8), je v anteriorní části prosencephala silný expresní pattern genu *Dlx3*, což by mohlo souviset s vysokou kondenzací buněk trigeminálního proudu v této oblasti. V pozdějších fázích vývoje je exprese genu *Dlx3* lokalizována dorzálně od cementových orgánů (Tab. 8).

Exprese genu *Dlx3* lokalizována v tomto místě může souviset s vývojem V. hlavového nervu, který inervuje cementové orgány. Ty slouží larvě bichira k přichycení k podkladu. Cementové orgány se stejně jako vnější žábry u bichira vyvíjejí velmi časně, jejich primordia se zakládají již během neurulace (Tab. 1). Jelikož cementové orgány a vnější žábry jsou orgány nezbytné pro přežití larvy, lze

vysvětlit tyto deviace v migraci hlavové neurální lišty bichira výše zmíněnými změnami.

Jeseter stejně jako bichir má příchytný larvální orgán. U jesetera se mi sice nezadařilo provést expresní analýzu genu *Dlx3*, nicméně pomocí protilátky HNK-1 se mi podařilo vizualizovat zakládající se hlavové nervy (Tab. 13 A,A´). Je to právě V. hlavový nerv, který zodpovídá za inervaci příchytných larválních orgánů (kupř. Frankenberger, 1927), a který je dle síly signálu navázané HNK-1 tím nejmasivnějším hlavovým nervem.

Trigeminální proud hlavové neurální lišty u bichira migruje jak již bylo řečeno z nejvíce anteriorní části prosencephala a poté migruje ventrálním směrem přes oční primordium (Tab. 2), což je velmi unikátní stav, protože ve standardním migračním schématu k takovéto migraci nedochází (kupř. axolotl: Cerny *et* al., 2004), protože buňky trigeminálního proudu oční primordium obcházejí a vytváří se tak sekundární proudy, preoptický a postoptický (Kuratani, 2005). Nicméně vyvstává otázka proč dochází k takovéto migraci. Já se domnívám, že tento ojedinělý typ migrace je ovlivněn vznikajícími cementovými orgány, které zabírají velkou část rostrální části hlavy a tak bezpochyby mají velký vliv na ostatní tkáně.

Na závěr tedy mohu konstatovat, že o bichirovi a jeseterovi se hovoří jako o bazálních paprskoploutvých rybách (kupř. Inoue *et* al., 2003) a je tedy očekáváno, že by měli mít bazální stav znaků. Má data však jasně ukazují, že co se týká typu embryonálního vývoje (Tab. 1 a 9), či migrace hlavové neurální lišty (Tab. 2 a Tab. 10), oba tyto druhy mají unikátní adaptace či posuny znaků. Nelze tedy říci, že bazální zástupci sdílejí nějakou archetypální patrnost migrace, ale je nutno spíše uvažovat o jedinečnosti migrace hlavové neurální lišty druh od druhu, která je ovlivněna různými faktory. Důležitým úkolem následujících let bude zjistit, jaký vliv mají tyto časoprostorové změny na utváření speciálních znaků a jak celý tento posun vzniká.

7. Závěr

V této diplomové práci byla důkladně prostudovaná migrace hlavové neurální lišty u dvou zástupců bazálních paprskoploutvých ryb, bichira senegalského (*Polypterus senegalus*) a jesetera malého (*Acipenser ruthenus*). U obou druhů byla migrace hlavové neurální lišty vymapována pomocí několika technik od rané neurulace až po pozdní fázi migrace neurální lišty. Byla tak seskupena data o počátcích migrace, samotné migraci a různých odlišnostech oproti klasickému migračnímu schematu.

Ukázalo se, že hlavová migrace u obou druhů vzniká velmi raně, už ve stadiích, kdy dochází k formování neurálních valů. U jesetera i bichira byly identifikovány obligátní tři migrační proudy hlavové neurální lišty, nicméně u bichira byla zaznamená velmi masivní a časná emigrace hyoidního proudu, což je naprosto unikátní stav, který zatím u jiných studovaných druhů nalezen nebyl. Tato heterotopie a heterochronie v migraci hyoidního proudu souvisí s velmi raným vývojem vnějších žaber, které jsou spolu s cementovými orgány naprosto klíčovými larválními orgány, bez kterých by larva bichira nebyla schopna přežít. U jesetera se vnější žábry nenalézají, nicméně i jeseter má příchytný larvální orgán. Ve spojitosti s raným vývojem příchytných orgánů bichira a jesetera byla u těchto druhů identifikována masivní migrace z rostrální části prosencephala, která může souviset s vývojem příchytných organů, jelikož buňky hlavové neurální lišty se podíejí na jejich inervaci.

Data představená v této diplomové práci přinesla první kompletní vyjevení migrace hlavové neurální lišty u bazálních paprskoploutvých ryb. V této práci je také poprvé popsaná migrační heterochronie a heterotopie hyoidního proudu hlavové neurální lišty u obratlovců a ta pak je diskutována s ekologicko-evoluční adaptací bichira.

V budoucnu by bylo vhodné rozšířit plejádu technik, která by umožnila rozklíčovat další jednotlivé detaily, které mohou dále napomoci lepšímu pochopení kontextu, jako např. kde přesně jsou lokalizovány rhombomery 3 a 5. Dále by bylo vhodné detailněji prostudovat jesetera, jelikož se u této ryby vyskytují poměrně archetypální struktury, tzv. hlavové kavity. Tyto struktury v hlavě jesetera vytvářejí velký počet dutin, které také mohou ovlivnovat migraci hlavové neurální lišty.

Závěrem lze říci, že se ukázalo, že i u bazálních zástupců, u kterých lze předpokládat jakousi původní podobu migrace, je patrnost této migrace hlavové neurální lišty velmi odlišná a liší se druh od druhu.

8. Seznam použité literatury

Abitua P.B., Wagner E., Navarrete I.A., Levine M. 2012. Identification of a rudimentary neural crest in a non-vertebrate chordate. *Nature* **492**, 104-107

Abzhanov, A. Protas, M., Grant, B.R., Grant, P.R., Tabin, C.J. 2004. Bmp4 and morphological variation of beaks in Darwin's finches. *Science* **305**, 1462 – 1465.

Abzhanov, A., Kuo, W.P., Hartmann, Ch., Grant, B.R., Grant, P.R., Tabin, C.J. 2006. The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches. *Nature* **442**, 563 - 567.

Aybar, M.J., Mayor, R. 2002. Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**, 452 - 458.

Bartsch P., Gemballa S. Piotrowski T. 1997. The embryonic and larval development of *Polypterus senegalus* Cuvier, 1829: its statiging with reference to external and skeletal features, behaviour and locomotory habits. *Acta Zoologica* **78**, 309- 328

Basch, M.L., Bronner-Fraser, M. 2006. Neural crest inducing signals. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **589**, 24 - 31.

Basch, M.L., García-Castro, M.I., Bronner-Fraser, M. 2004. Molecular mechanisms of neural crest induction. *Birth Defects Research* **72**, 109 - 123.

Begbie, J., Brunet, J.F., Rubenstein, J.L., Graham, A. 1999. Induction of the epibranchial placodes. *Development* **126**, 895 - 902.

Bemis, W.E., Grande, L. 1992. Early development of the actinopterygian head. I. External development and staging of the paddlefish *Polyodon spathula. Journal of Morphology* **213**, 47 - 83.

Birgbauer, E., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M., Fraser, S. 1995. Rhombomeric origin and rostrocaudal reassortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development* **121**, 935 - 945.

Bolker J.A. 1993. Gastrulation and mesoderm morphogenesis in the white sturgeon. *Journal of Experimental Zoology* **266**, 116-131

Bradley, L.C., Snape, A., Bhatt, S. , Wilkinson, D.G. 1993. The structure and expression of the *Xenopus Krox-20* gene: conserved and divergent patterns of expression in rhombomeres and neural crest. *Mechanisms of Development* **40**, 73 - 84.

Bronner-Fraser, M. 1986. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Developmental Biology* **115**, 44-55

Bronner-Fraser, M. 1993. Mechanisms of neural crest cell migration. *BioEssays* **15**, 221 - 230.

Bronner-Fraser, M. 1994. Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *The FASEB Journal* **8**, 699 - 706.

Carmona-Fontaine, C., Matthews, H.K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G.A., Parsons, M., Stern, C.D., Mayor, R. 2008. Contact inhibition of locomotion *in vivo* controls neural crest directional migration. *Nature* **456**, 957 - 961.

Caroll S.B., Grenier J.K., Weatherbee S.D. 2001. From DNA to diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design. *Malden, Mass: Blackwell Science*

Cerny, R., Meulemans, D., Berger, J., Wilsch-Bräuninger, M., Kurth, T., Bronner-Fraser, M., Epperlein, H.-H. 2004. Combined intrinsic and extrinsic influences pattern cranial neural crest migration and pharyngeal arch morphogenesis in axolotl. *Developmental Biology* **266**, 252 - 269.

Clark, Ch.T. & Smith, K.K. 1993. Cranial osteogenesis in *Monodelphis domestica* (Didelphidae) and *Macropus eugenii* (Macropodidae). *Journal of Morphology* **215**, 119 - 149.

Couly, G., Creuzet, S., Bennaceur, S., Vincent, Ch. & Le Douarin, N.M. 2002. Interactions between Hox-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. *Development* **129**, 1061 - 1073.

Creuzet, S., Schuler, B., Couly, G., Le Douarin, N.M. 2004. Reciprocal relationships between *Fgf8* and neural crest cells in facial and forebrain development. *PNAS* **101**, 4843 - 4847.

Crkvová B. 2012. Komparativní vývojová morfogeneze vnějších žaber obratlovců. Diplomová práce. *Katedra Zoologie, PřF UK v Praze*

del Pino, E.M., Medina, A. 1998. Neural development in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *International Journal of Development Biology* **42**, 723 - 731.

Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., Philippe, H. 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* **439**, 965 - 968.

Dettlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. 1993. Sturgeon Fishes, Developmental Biology and Aquaculture. *Springer*

Dickinson, M.E., Selleck, M.A., McMahon, A.P., Bronner-Fraser, M. 1995. Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development* **121**, 2099 - 2106.

Diedhiou S., Bartsch P. 2009. Staging of the Early Development of *Polypterus* (Cladistia: Actinopterygii). In: Kunz, Y. *Development of non-teleost fishes.* (*Science Publishers: Enfield NH.2009*)

Donoghue, P.C.J., Graham, A., Kelsh, R.N. 2008. The origin and evolution of the neural crest. *BioEssays* **30**, 530 - 541.

Duband, J.L., Monier, F., Delannet, M., Newgreen, D. 1995. Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anatomica* **154**, 63 - 78.

Eisen, J.S., Weston, J.A. 1993. Development of the neural crest in the zebrafish. *Developmental Biology* **159**, 50 - 59.

Erickson C.A., Loring J.F., Lester S.M. 1989. Migratory pathways of HNK-1-immunoreactive neural crest cells in the rat embryo. *Developmental Biology* **134**, 112-118

Ericsson, R., Cerny, R., Falck, P., Olsson, L. 2004. The role of cranial neural crest cells in visceral arch muscle positioning and patterning in the Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Dynamics* **231**, 237-247.

Ericsson, R., Joss, J. , Olsson, L. 2008. The fate of cranial neural crest cells in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri. Journal of Experimental Zoology* **310B**, 345 - 354.

Falck, P., Joss, J., Olsson, L. 2000. Cranial neural crest cell migration in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri. Evolution & Development* **2**, 179 - 185.

Falck, P., Hanken, J. ,Olsson, L. 2002. Cranial neural crest emergence and migration in the Mexican axolotl *(Ambystoma mexicanum). Zoology* **105**, 195 - 202.

Freund, R., Dörfler, D., Popp, W., Wachtler, F. 1996. The metameric pattern of the head mesoderm — does it exist? *Anatomy and Embryology* **193**, 73 - 80.

Gans, C., Northcutt, R.G. 1983. Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science* **15**, 268 - 273.

Gans, C., Northcutt, R.G. 1985. The brain and sense organs of the earliest vertebrates: reconstruction of a morphotype. *Evolutionary Biology of Primitive Fishes* **103**, 81 - 112.

Gardiner B.G., Schaeffer B., Masserie J.A. 2005. A review of the lower actinopterygian phylogeny. *Zooological Journal of the Linnean Society* **144**, 511-525

Gilbert S. F. 2010. Developmental biology. Ninth edition. *Sinauer Associates,Inc., Publishers*

Goodrich E.S. 1909. Studies on the structure and development of vertebrates. Vol. II. Chapters 9-14. *Dover publications, Inc. New York and Constable and Company Ltd. London*

Graham, A., Heyman, I., Lumsden, A. 1993. Even-numbered rhombomeres control the apoptotic elimination of neural crest cells from odd-numbered rhombomeres in the chick hindbrain. *Development* **119**, 233 - 245.

Graham, A., Francis-West, P., Brickell, P., Lumsden, A. 1994. The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature* **372**, 684 - 686.

Graham, A., Begbie, J., McGonnell I. 2004. Significance of the cranial neural crest. *Developmental Dynamics* **229**, 5 - 13.

Grande, L., Bemis, W.E. 1991. Osteology and phylogenetic relationships of fossil and recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the interrelationships of Acipenseriformes. *Journal of Vertebrate Paleontology* **11**, 1 - 121.

Griffith C.M., Hay E.D. 1992. Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development* **116**, 1087-1099

Hall, B.K. 2009. The neural crest in development and evolution. *Springer*

Hall B. K. 2001. John Samuel Budgett (1872-1904): In Pursuit of Polypterus. *BioScience* **51***,* 399-407

Hall B.K. 2003. Evo-Devo: evolutionary developmental mechanisms. *International Journal of developmental Biology* **47**, 491-495

Hall, B.K. 2009. The neural crest and neural crest cells in vertebrate development and evolution. *Springer*

Horigome N., Myojin M., Ueki T., Hirano S., Aizawa S., Kuratani S. 1999. Development of cephalic neural crest cells in embryos of *lampetra japonica*, with special reference to the evolution of the jaw. *Developmental Biology* **207**, 287-308

Ichikawa, M. 1937. Experiments on the Amphibian Mesectoderm, with special reference to the cartilage-formation. *Memoirs of the college of Science, Kyoto Imperial University, Series B.* **XII,** 312-351

Inoue J.G., Miya M., Tsukamoto K., Nishida M. 2003. Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the "ancient fish". *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**, 110-120

Jacobson A.G., Meier S. 1984. Morphogenesis of the head of a newt: Mesodermal segments, neuromeres, and distribution of neural crest. *Developmental Biology* **106**, 181-193

Jacobson A.G. 1988. Somitomeres: mesodermal segments of vertebrate embryos. *Development* **104 Suppl.,** 209-20

Johnston M.C.A. 1966. A radioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo. *Anatomical Record* **156**, 143-155

Kang Y., Massagué J. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell* **118**, 277-279

Kardong K.V. 2009. Vertebrates: Comparative anatomy, function, evolution, Fifth edition. *McGraw-Hill*

Kerr J.G. 1903. The development of *Polypterus senegalus* Cuv. In: *The work of John Samuel Budgett, Balfour student of The University of Cambridge: Being a collection of his zoological papers, together with a biographical sketch by A.E.Shipley, F.R.S., and contributions by Richard Assheto, Edward T.Browne, J.Herbert Budgett and J.Graham Kerr* (ed. Kerr J.G.). pp. 195-289. Cambridge: *Cambridge University Press*

Kontges G., Lumsden A. 1996. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **122**, 3229-3242

Krull C.E. 2001. Segmental organization of neural crest migration. *Mechanisms of development* **105**, 37-45

Kubota Y., Ito K. 2000. Chemotactic migration of mesencephalic neural crest cells in the mouse. *Developmental Dynamics*. **217**, 170-179

Kulesa P.M., Fraser S.E. 1998. Neural crest cell dynamics revealed by time-lapse video microscopy of whole embryo chick explant cultures. *Developmental Biology* **204**, 327-344

Kulesa P.M., Bronner-Fraser M., Fraser S.E. 2000.0. In ovo time-lapse analysis after dorsal neural tube ablation shows rerouting of chick hindbrain neural crest. *Development* **127**, 2843-2852

Kulesa P.M., Ellies D.L., Trainor P.A. 2004. Comparative analysis of neural crest cell death, migration, and function during vertebrate embryogenesis. *Developmental Dynamics* **229**, 14-29

Kulesa P.M., Lu C.C., Fraser S.E. 2005. Time-Lapse Analysis Reveals a Series of Events by Which Cranial Neural Crest Cells Reroute around Physical Barriers. *Brain, Behavior and Evolution* **66**, 255-265

Kulesa P.M, Bailey C.M., Kasemeier-Kulesa J.C., McLennan R. 2010. Cranial neural crest migration: New rules for an old road. *Developmental Biology* **344**, 543-554

Kundrát M. 2009. Heterochronic shift between early organogenesis and migration of cephalic neural crest cells in two divergent evolutionary phenotypes of archosaurs: crocodile and ostrich. *Evolution & Development* **11**, 535-546

Kuratani S., Matsuo I., Aizawa S. 1997. Developmental patterning and evolution of the mammalian viscerocranium: Genetic insights into comparative morphology. *Developmental Dynamics* **209**, 139-155

Kuratani S., Horigome N., Hirano S. 1999. Developmental morphology of the head mesoderm and reevaluation of segmental theories of the vertebrate head: evidence from embryos of an agnathan vertebrate, *Lampetra japonica*. *Developmental Biology* **210**, 381-400

Kuratani S., Horigome N. 2000. Developmental morphology of branchiomeric nerves in a cat shark, *Scyliorhinus torazame*, with special reference to rhombomeres, cephalic mesoderm, and distribution patterns of cephalic crest cells. *Zoological Science* **17**, 893-909

Kuratani S., Nobusada Y., Saito H., Shigetani Y. 2000. Morphological characteristics of the developing cranial nerves and mesodermal head cavities in sturgeon embryos from early pharyngula to late larval stages. *Zoological Science* **17**, 911-933

Kuratani S. 2005. Craniofacial development and the evolution of the vertebrates: the old problems on a new background. *Zoological Science* **22**, 1-19

LaBonne C., Bronner-Fraser M. 1998. Neural crest induction in Xenopus: evidence for a two-signal model. *Development* **125**, 2403-2414

Landacre F.L. 1921. The fate of the neural crest in the head of the urodeles. *Journal of Comaparative Neurology* **33**, 39-40

Langille R.M., Hall B.K. 1987. Development of the head skeleton of the Japanese medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei). *Journal of Morphology* **193**, 135-158

Langille R.M., Hall B.K. 1988. Role of the neural crest in development of the cartilaginous cranial and visceral skeleton of the medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei). *Anatomy and Embryology* **177**, 297-305

Le Douarin N. M., Kalcheim C. 1999. The neural crest, second edition. *Cambridge*

University Press

Le Douarin N.M., Creuzet S., Couly G., Dupin E. 2004. Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* **131**, 4637-4650

Le Douarin N.M. 1974. Cell recognition based on natural morphological nuclear markers. *Medical Biology* **52**, 281-319

Liang J.O, Etheridge A., Hantsoo L. Rubinstein A.L.,Nowak S.J., Izpisua Belmonte J.C., Halpern M.E. Asymmetric nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ. *Development* **127**, 5101-5112

Lumsden A., Sprawson N., Graham A. 1991. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* **113**, 1281-1291

Metscher B.D., Ahlberg P.E. 1999. Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies. *Developmental Biology* **210**, 1-14

Meulemans D., Bronner-Fraser M 2004. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Developmental cell* **7**, 291-299

Micalizzi D.S., Farabaugh S.M., Ford H.L. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **15**, 117-134

Minařík M. 2011. Vývojová morfogeneze příchytných žláz a orgánů u nižších obratlovců. Diplomová práce. *Katedra Zoologie, PřF UK v Praze*

Mitgutsch Ch., Piekarski N., Olsson L., Haas A. 2008. Heterochronic shifts during early cranial neural crest cell migration in two ranid frogs. *Acta Zoologica* **88**, 1-10

Moury J.D., Hanken J. 1995. Early cranial neural crest migration in the direct-developing frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Acta Anatomica* **153**, 243-253

Nelson J.S. 2006. Fishes of the world. Fourth Edition. *John Wiley & Sons, Inc.*

Nieto M.A., Gilardi-Hebenstreit P., Charnay P., Wilkinson D.G. 1992. A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mesoderm. *Development* **116**, 1137-1150

Nieto M.A., Sechrist J., Wilkinson D.G., Bronner-Fraser M. 1995. Relationship between spatially restricted Krox-20 gene expression in branchial neural crest and segmentation in the chick embryo hindbrain. *The EMBO Journal* **18**, 1697-1710

Noden D.M. 1986. Patterning of avian craniofacial muscles. *Developmental Biology* **116**, 347-356

Noden D.M. 1988. Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development* **103**, 121-140

Noden D.M. 1991. Cell movements and control of patterned tissue assembly during craniofacial development. *Journal of Craniofacial Genetic and Developmental Biology* **11**, 192-213

Olsson L., Hanken J. 1996. Cranial neural-crest migration and chondrogenic fate in the oriental fire-bellied toad *Bombina orientalis*: Defining the ancestral pattern of head development in anuran amphibians. *Jouranl of Morphology* **229**, 105-120

Olsson L., Falck P., Lopez K., Cobb J., Hanken J. 2001. Cranial neural crest cells contribute to connective tissue in cranial muscles in the anuran amphibian, *Bombina orientalis*. *Developmental Biology* **237**, 354-367

Ostaszewska T., Dabrowski K. 2009. Early Development of Acipenseriformes (Chondrostei: Actinopterygii). In: Kunz, Y. *Development of non-teleost fishes.* (*Science Publishers: Enfield NH.2009*)

Osumi-Yamashita N., Ninomiya Y., Eto K., Doi H. 1994. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryo. *Developmental Biology* **164**, 409-419

Papan C., Campos-Ortega J.A. 1994. On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. *Roux's archives of developmental biology* **203**, 178-186

Parsons K.J, Albertson R.C. 2009. Roles for Bmp4 and CaM1 in shaping the jaw: Evo-Devo and beyond. *Annual Review of Genetics* **43**, 369-388

Pieper M., Eagleson G.W., Wosniok W., Schlosser G. 2011. Origin and segregation of cranial placodes in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology.* **360**, 257-275

Platt J.B. 1893. Ectodermic origin of the cartilages of the head. *Anatomischer Anzeiger* **8**, 506-509

Raible D.W., Eisen J.S. 1994. Restriction of neural crest cell fate in the trunk of the embryonic zebrafish. *Development* **120**, 495-503

Rickman M., Fawcett J.W., Keynes R.J. 1985. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons trhrough the rostral half of the chick somite. *Journal of Embryology and experimental Morphology* **90**, 437-455

Roberts R.B, Hu Y., Albertson R.C., Kocher T.D. 2011. Craniofacial divergence and ongoing adaptation via the hedgehog pathway. *PNAS* **108**, 13194-13199

Roček Z. 2002. Historie obratlovců. Evoluce, fylogeneze, systém. *Academia*

Sadaghiani B., Thiébaud Ch.H. 1987. Neural crest development in the *Xenopus laevis* embryo, studied by interspecific transplantation and scanning electron microscopy. *Developmental Biology* **124**, 91-110

Sadaghiani B., Vielkind J.R. 1989. Neural crest development in Xiphophorus fishes: scanning electron and light microscopic studies. *Development* **105**, 487-504

Sadaghiani B., Vielkind J.R. 1990. Distribution and migration pathways of HNK-1-immunoreactive neural crest cells in teleost fish embryos. *Development* **110**, 197-209

Saldivar J.R., Sechrist J.W., Krull C.E., Ruffins S., Bronner-Fraser M. 1997. Dorsal hindbrain ablation results in rerouting of neural crest migration and changes in gene expression, but normal hyoid development. *Development* **124**, 2729-2739

Scaal M., Gros J., Lesbros C., Marcelle Ch. 2004. In ovo electroporation of avian somites. *Developmental Dynamics* **229**, 643-650

Sechrist J., Serbedzija G.N., Scherson T., Fraser S.E., Bronner-Fraser M. 1993. Segmental migration of the hindbrain neural crest does not arise from its segmental generation. *Development* **118**, 691-703

Serbedzija G.N, Bronner-Fraser M., Fraser S.E. 1989. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development* **106**, 809-816

Serbedzija G.N, Bronner-Fraser M., Fraser S.E. 1992. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development* **116**, 297-307

Schilling T.F., Kimmel Ch.B. 1994. Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* **120**, 483-494

Schlosser G. 2010. Chapter Four-Making Senses: Development of Vertebrate cranial placodes. *International Review of Cell and Molecular Biology* **283**, 129-234

Slípka J. 1986. Evolutionary morphology of the branchial region as the reflection of environemental changes. *Behaviour, adaptation and evolution*. 203-211

Smith K.K. 1994. The development of craniofacial musculature in *Monodelphis domestica* (Marsupialia, Didelphidae). *Journal of Morphology* **222**, 149-173

Smith K. K. 2001. Early development of the neural plate, neural crest and facial region of marsupials. *Journal of Anatomy* **199**, 121-131

Smith K.K. 2003. Time's arrow: heterochrony and the evolution of development. *International Journal of Developmental Biology* **47**, 613-621

Stone L.S. 1922. Some notes on the migration of neural crest cells in *Rana palustris*. *Anatomical Records* **23**, 39-40

Takeuchi M., Takashashi M., Okabe M., Aizawa S. 2009. Germ layer patterning in bichir and lamprey; an insight into its evolution in vertebrates. *Developmental Biology* **332**, 90-102

Tan S.S., Morris-Kay G. 1985. The development and distribution of the cranial neural crest in the rat embryo. *Cell Tissue Research* **240**, 403-416

Tan S.S., Morris-Kay G. 1986. Analysis of cranial neural crest cell migration and early fates in postimplantation rat chimaeras. *Journal of Embryology and experimental Morphology* **98**, 21-58

Theveneau E., Mayor R. 2012. Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology* **336**, 34-54

Tokita M. 2006. Cranial neural crest cell migration in cockatiel *Nymphicus hollandicus* (Aves: Psittaciformes). *Journal of Morphology* **267**, 333-340

Tosney K.W. 1982. The segregation and early migration of cranial neural crest cells in the avian embryo. *Developmental Biology*

89, 13-24

Trainor P.A., Tam P.P. 1995. Cranial paraxial mesoderm and neural crest cells of the mouse embryo: co-distribution in the craniofacial mesenchyme but distinct segregation in branchial arches. *Development* **121**, 2569-2582

Tucker R.P. 2004. Neural crest cells: a model for invasive behavior. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 173-177

Vaglia J.L., Smith K.K. 2003. Early differentiation and migration of cranial neural crest in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Evolution & Development* **5**, 121-135

Vickaryous M.K., Hall B. K. 2006. Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. *Biological review* **81**, 425-455

Wilkinson D.G., Bhatt S., Chavrier P., Bravo R., Charnay P. 1989. Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* **337**, 461-464

Wu J., Saint-Jeannet J.-P., Klein P.S. 2003. Wnt-frizzled signaling in neural crest formation. *Trends in Neurosciences* **26**, 40-45

Zelditch M.L., Fink W.L. 1996. Heterochrony and heterotopy: stability and innovation in the evolution of form. *Paleobiology* **22**, 241-254

Zelditch M. 2003. Space, Time, and Repatterning. In Hall B.K., Olson W.M.: *Keywords and Concepts in Evolutionary Developmental Biology* (*Harvard University Press, 2003)*

Sekundární citace

Hörstadius S., Sellman S. 1946. Experimentelle untersuchungen über die Determination des Knorpeligen Kopfskelettes bei Urodelen. *Nova Acta Royal Society Scientist Upsala serie 4,* **13**, 1-170

Chibon P. 1967. Marquage nucléaire par la thymidine tritiée des dérivés de la crête neurale chez l'amphibien urodèle Pleurodeles waltlii Michah*. Journal of Embryology and Experimental Morphology* **18**, 343-358

Le Douarin N.M. 1971. Comparative ultrastructural study of the interphasic nucleus in the quail (*Coturnix coturnix japonica*) and the chicken (*Gallus gallus*) by the regressive EDTA staining method. *C.R. Acad. Science, Serie III.* 2334-2337