

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie**

Studijní program: Zoologie
Studijní obor: Zoologie



Mgr. Martin Minařík

**Vývoj, evoluce a homologie příchytých žláz a
orgánů nižších obratlovců**

**Ontogeny, evolution & homology of cement glands
and attachment organs in lower vertebrates**

Disertační práce

Školitel: Mgr. Robert Černý, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

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

V Cambridge, 15. září 2017

.....

Podpis

Poděkování

Vzhledem k době strávené v doktorském studiu by se kompletní výčet díků svou délkou snadno vyrovnal seznamu citovaných publikací. Zvláštní poděkování tak v úvodu zkrácené verze patří těm, jejichž jména zůstala skryta za označením příslušných kolektivů a laboratoří. Zásadním inkubačním médiem během mé vědecké přípravy pro mě byla Laboratoř pro studium kraniofaciální evoluce a vývoje, vedená mým školitelem Robertem Černým, jenž mě již na počátku bakalářského studia přesvědčil o tom, že cementové orgány obratlovců nejsou tak nezajímavé, jak by se na několik prvních pohledů mohlo zdát. Členové laboratoře se mi stali rodinou, s níž jsem sdílel ty nejtěžší i nejradostnější okamžiky mého pražského života. Stejně jako *Dissertationvater* si tak zvláštní dík zaslouží mí drazí *Dissetationbrüder* Jan Štundl a Vladimír Soukup a *Dissertationschwestern* Anička Pospíšilová a Zuzka Karpecká. Nemožno ovšem opomenout ani nověji příchozí – Terezu Matějkovou, Kristýnu Markovou, Viktorii Psutkovou a Rolfa Ericssona, případně recentního odpadlíka Petra Fabiana, stejně jako občasného, o to však vítanějšího návštěvníka Davida Jandzika.

Mé doktorské studium by nebylo úplné bez proběhlých stáží. Velký dík patří Brianu D. Metscherovi, Anně Nele Herdina, stejně jako dalším členům Brianovy laboratoře ve Vídni, kteří mě zasvětili do tajů mikrotomografie (Šárce Bejdové z katedry antropologie pak vděčím za zajištění přístupu k softwaru, v němž mohla být ve Vídni získaná data analyzována po návratu do Prahy). Díky Leninovi Ariasovi Rodriguezovi se poslední tři roky proměnily v pravé tropické dobrodružství, a umožnily mi při studiu rané embryogeneze kostlína poznat pocit, jaký jistě cítil už J. S. Budgett, když poprvé pozoroval vzácné embryo, od něhož si sliboval zodpovězení všech otázek života, vesmíru a vůbec. Během pobytu v Mexiku mi byla neocenitelnou pomocnicí v líně, laboratoři, kuchyni i ulicích chaotické Villahermosy Adriana Osorio Pérez, ale i další členové laboratoře. Zuzaně Majtánové děkuji za usnadnění prvních kontaktů s Mexikem. Zatímco já jsem cestoval, o blaho našich vlastních ryb se s vypětím všech fyzických i duševních sil starali Vojta Miller a Karel Kodejš a jen díky nim se naši bichiři opět radostně množí. Jeseteří tým kolem Martina Pšeničky z Vodňan si zaslouží nezměrné díky za pohostinnost a nakažlivé nadšení pro studium posledního z třetice druhů, jež byly tak zásadní pro předkládaný projekt. Mé současné vedoucí Clare Baker děkuji za možnost sepisovat disertaci nejen ve volném čase.

Závěrem děkuji své biologické rodině, bez jejíž podpory a bezbřehé tolerance bych se na dráhu přírodovědce vydal jen stěží. Největší dík pak patří mé ženě Adélce, která, ač sama archeoložka a historička umění, učinila nelehké rozhodnutí provdat se za zoologa se vším, co takové soužití přináší (případně nepřináší), a doposud jej nezačala litovat.

Práce by v předkládaném rozsahu nevznikla, nebýt finanční podpory Grantové agentury UK (projekty GA UK č. 220213 a 726516), Grantové agentury České Republiky (grant GAČR č. 16-23836S), BMWFW Österreich (stipendium Aktion Österreich–Tschechien), Přírodovědecké fakulty UK (STARS stipendium a projekty SVV) a Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Mexiko.

Prohlášení o podílu na publikacích

Data prezentovaná v dizertační práci Mgr. Martina Minaříka byla získána přímo autorem práce, pokud v textu či popisu obrázku není uvedeno jinak. Podíl na přiložené publikaci je specifikován níže.

Minarik, M., Stundl, J., Fabian, P., Jandzik, D., Metscher, B. D., Psenicka, M., Gela, D., Osorio-Pérez, A., Arias-Rodriguez, L., Horáček, I., Cerny, R. (2017). Pre-oral gut contributes to facial structures in non-teleost fishes. *Nature*, 547(7662), 209–212.

Podíl M. Minaříka:

Fate-mapping experimenty na živých embryích bichira, jesetera a kostlína a jejich následné vyhodnocení, včetně odchovu embryí do příslušných stádií. Příprava vzorků pro mikrotomografii, následné vyhodnocení hotových rekonstruovaných virtuálních řezů a segmentace entodermu pro jeho selektivní 3D zobrazení. *In situ* hybridizace *pitx2* a *bmp4* u bichira. Veškeré elektronmikroskopické, imunohistochemické a histologické analýzy s výjimkou ISH u genů, jež nejsou uvedeny výše. Tvorba obrazových tabulí. Sepsání textu manuskriptu společně s Robertem Černým a s přispěním spoluautorů.

.....
Mgr. Robert Černý, Ph.D.

Abstrakt

Celá řada obratlovců se v raných stádiích larválního vývoje vyznačuje přítomností takzvaných cementových či adhezivních orgánů. Tyto specializované, kraniálně lokalizované žlázy produkují mukopolysacharidový sekret, jenž umožňuje larvám přichycení k substrátu a tím i setrvání v prostředí s dostatkem kyslíku a mimo dosah predátorů až do doby, než se plně vyvine trávicí a pohybová soustava. Detailně prostudovaným příkladem tohoto typu orgánu je cementová žláza drápatky vodní (*Xenopus laevis*), jež slouží jako modelový orgán diferenciaci anteriorních struktur hlavy. Na základě exprese některých transkripčních faktorů a shodného ektodermálního původu byla navržena homologie cementových žláz drápatky a kostnatých (Teleostei) s adhezivními papilami sumek. Nedostatek znalostí o podobných orgánech dalších skupin však jakékoli definitivní vyslovení homologie na takto široké fylogenetické škále značně komplikovala.

V předkládané práci jsem se zaměřil na studium cementových orgánů či jim odpovídajících struktur u tří druhů bazálních paprskoploutvých ryb: bichira senegalského (*Polypterus senegalus*), jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a kostlína mexického (*Atractosteus tropicus*). S použitím *in vivo* značení buněk epitelu prvostřeva, doplněného vizualizací hlavového entodermu pomocí počítačové mikrotomografie se podařilo prokázat, že cementové orgány u těchto skupin vznikají z vnitřní zárodečné vrstvy, tedy z entodermu. Přes odlišný zárodečný původ tyto struktury nicméně exprimují shodné geny, jež jsou klíčové pro vznik cementové žlázy drápatky. Zdá se tak, že v evoluci cementových orgánů došlo k posunu odpovídajících vývojových mechanismů z ektodermu do těsně sousedícího nejanteriornějšího entodermu.

Primordia cementových orgánů se zakládají jako výchlípky v rámci přední stěny prvostřeva a následně migrují k povrchu, kde splývají s vnějším ektodermem preorální oblasti. Prezentované výsledky tak představují preorální populaci entodermu jakožto svébytnou morfogenetickou doménu, jež zásadním způsobem ovlivňuje standardní rozvrh morfogeneze hlavy obratlovců. Zároveň se jedná o první detailně popsany případ příspěvku entodermu do vnějšího povrchu těla u obratlovců vůbec. Výskyt předústního střeva jasně ukazuje, že se jedná o ancestrální rozvrh embryogeneze pro všechny paprskoploutvé a naznačuje, že ke ztrátě entodermálních cementových orgánů došlo u kostnatých sekundárně v důsledku modifikace raného zárodečného vývoje meroblastickým rýhováním vajíčka. Přítomnost rudimentárního předústního střeva u dalších linií obratlovců, stejně jako odpovídajících struktur u kopinatce či polostrunatců, naznačuje, že entodermální původ cementových orgánů bazálních paprskoploutvých může odkazovat na vývojové procesy přítomné u společného předka všech strunatců.

Klíčová slova: cementové orgány, bichir, jeseter, kostlín, drápatka, embryogeneze, hlava, entoderm, předústní střevo, prechordální destička, paprskoploutví, obratlovci, strunatci, homologie

Abstract

Aquatic larvae of many vertebrate lineages develop specialized, cranially located cement or attachment glands which allow them to remain attached to a substrate by means of polysaccharide secretion. The larvae can thus remain still and safe in well-oxygenated water out of reach of any predators until the digestive and locomotory apparatus fully develops. *Xenopus* cement gland is the most thoroughly studied example of this type of glands, since it was used as a model for the anteriormost patterning of the developing head. Based on shared expression patterns of key transcription factors and a similar ectodermal origin it has been repeatedly suggested that *Xenopus* cement gland is homologous to adhesive organs of teleosts and adhesive papillae of ascidians. The lack of comprehensive knowledge on this type of glands in other lineages however rendered any considerations of homology among such a distant lineages rather inconclusive.

In the present work I have focused on a detailed study of the cement glands and other corresponding structures in three representatives of basal actinopterygian lineages: Senegal bichir (*Polypterus senegalus*), sterlet (*Acipenser ruthenus*), and tropical gar (*Atractosteus tropicus*). Using a combination of *in vivo* fate-mapping approaches with a Micro-CT imaging of cranial endoderm to follow endoderm contribution to developing head structures I conclusively demonstrate an endodermal origin of cement glands in all three species. Despite different germ layer origin, cement glands of basal actinopterygians show the same expression patterns as *Xenopus* cement gland, suggesting that a developmental system drift might have occurred during cement gland evolution, resulting in a shift of their initiation from the anterior ectoderm to the immediately adjacent anteriormost endoderm.

Cement gland primordia in basal actinopterygians develop as diverticula of the anterior foregut wall, subsequently migrating towards the embryonic surface where they incorporate into the surface ectoderm in the preoral region. These results thus allow us to characterize the preoral endoderm as a distinct morphogenetic domain, which substantially alters the standard mode of vertebrate head development. At the same time these findings represent the first thoroughly described example of endodermal contribution to craniofacial surface in vertebrates. The presence of preoral gut in all the three lineages implies that it represents an ancestral mode of development for the ray-finned fishes and indicates that this domain was secondarily lost in teleosts due to the radical transformation of their early development as a result of meroblastic cleavage. The presence of vestigial, preoral gut-like structures in other vertebrates, as well as in the lancelet or acorn worms suggests that the endodermal origin of cement glands in basal actinopterygians may represent an ancient blueprint of chordate head development.

Keywords: cement glands, bichir, sturgeon, gar, xenopus, embryonic development, head, endoderm, preoral gut, prechordal plate, actinopterygians, vertebrates, chordates, homology

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt..... | 9 |
| Abstract..... | 11 |
| Obsah | 13 |
| 1. Úvod..... | 15 |
| 2. Cíle práce..... | 20 |
| 3. Výsledky..... | 22 |
| 3.1 Základní charakteristika cementových orgánů | 22 |
| 3.2 Inervace jako argument pro homologii | 23 |
| 3.3 In vivo důkaz entodermálního původu cementových orgánů značením pomocí CM-Dil..... | 25 |
| 3.4 Vizualizace hlavového entodermu bazálních paprskoploutvých pomocí počítačové mikrotomografie..... | 28 |
| 3.5 Přes odlišný zárodečný původ cementové žlázy sdílí expresi klíčových genů.... | 30 |
| 4. Seznam vyobrazení..... | 32 |
| 5. Diskuse | 33 |
| 5.1 Homologie cementových orgánů ve světle nových poznatků | 33 |
| 5.2 Předústní střevo v kontextu evoluce obratlovců | 35 |
| 5.3 Význam studia cementových orgánů bazálních paprskoploutvých..... | 43 |
| 6. Závěr..... | 46 |
| 7. Materiál a metody..... | 49 |
| 7.1 Embrya a larvy studovaných druhů..... | 49 |
| 7.2 Skenovací elektronová mikroskopie..... | 50 |
| 7.3 PAS barvení | 50 |
| 7.4 Histologie..... | 51 |
| 7.5 Imunohistochemie | 51 |
| 7.6 Transplantace cementových orgánů | 52 |
| 7.7 Fate-mapping | 53 |
| 7.8 Micro CT..... | 55 |

| | |
|--|----|
| 7.9 Enzymatická metalografie..... | 56 |
| 7.10 RNA <i>in situ</i> hybridizace..... | 57 |
| 7.11 Mikroskopická technika a analýza dat..... | 58 |
| 8. Seznam literatury | 59 |
| 9. Přiložená publikace | 65 |

1. Úvod

Cementové orgány, jindy také označované jako adhezivní, přichytné, či cementové žlázy, jsou specializované struktury na hlavě embryí a larev mnoha skupin obratlovců, jež si uchovávají typické volně ve vodě žijící larvální stádium. Jedná se zpravidla o shluky vysoce specializovaných sekretorických buněk (Groppelli *et al.*, 2003), výrazně apikobazálně protažených a vyplněných sekretorickými váčky, jež zatlačují jádro do blízkosti bazální membrány (Benneman & Pietzsch-Rohrschneider, 1978). Produktem žláz je sekret bohatý na mukopolysacharidy, jenž umožňuje larvám ihned po vylíhnutí pevné přichycení na vhodném substrátu či zavěšení pod vodní hladinou (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005). Larvy takto setrvávají na bezpečném, dobře okysličeném místě mimo dosah predátorů, dokud nejsou schopny samostatného pohybu a získávání potravy (Britz *et al.*, 2000).

Typickým příkladem cementových orgánů jsou ty, jež nalézáme u pulců žab. První náznak vyvíjející se žlázy je možno pozorovat již velmi záhy po začátku neurulace, kdy se v ektodermu těsně pod anteriorním neurálním valem formuje nápadný shluk pigmentových buněk (Sive & Bradley, 1996) – kromě vlastní neurální ploténky tedy jde o první komplexní orgán, jež je na povrchu vyvíjejícího se embrya patrný (Kerr, 1919). S pokračující neurulací se budoucí buňky cementového orgánu prodlužují a orgán postupně nabývá finální podoby. Dlouho před otevřením úst (jež u žab vznikají v těsném sousedství, dorzálně od cementového orgánu; Dickinson & Sive, 2006; Jacox *et al.*, 2014) a s vylíhnutím embrya je žláza již plně vyvinuta a produkuje adhezivní sekret. Pulci poté stráví několik dní přichycení k substrátu, v případě drápatky *Xenopus laevis* dokonce orgán tvoří mukopolysacharidové vlákno přibližně o délce samotného pulce, které umožňuje zavěšení za ponořenou vegetaci či vodní hladinu (Duellman & Trueb, 1986). Jakmile se však dostatečně vyvine ploutevní lem a orální disk sloužící k získávání potravy, cementová žláza bezzbytku zaniká. Obdobně je tomu také u dalších skupin obratlovců (pro detailní přehled viz Minařík, 2009 a Minařík, 2011).

Jakkoli se jedná o dočasné, bez výjimky embryonální a larvální orgány, jež v dospělých stádiích zcela mizí (Groppelli *et al.*, 2003), dostává se těmto žlázám v odborné literatuře dlouhodobé pozornosti přibližně od 70. let 20. století, kdy byla cementová žláza drápatky zavedena jako modelový orgán pro studium diferenciac embryonálních tkání (Picard, 1975a, b). Zejména zásluhou Amandy Dickinson a Hazel

Sive se posléze táž embryonální struktura ujala jako zjednodušený model pro studium diferenciace anteriorní části hlavy, zejména pak indukce neurálních tkání, s nimiž cementová žláza sdílí některé klíčové indukční faktory (Wardle & Sive, 2003; Dickinson & Sive, 2006). Na základě studia morfogeneze a genové exprese v přední části embrya byla postupně definována takzvaná extrémně anteriorní doména (*extreme anterior domain*) vyvíjející se obratlovčí hlavy, která je charakteristická přímým kontaktem ektodermální a entodermální zárodečné vrstvy (Dickinson a Sive, 2007) bez účasti mezodermu. V rámci této ekto-entodermální kontaktní zóny se následně za přispění konkrétních paralogů *Pitx* exprimovaných v příslušných částech embryonálního ektodermu vyvíjí právě cementová žláza, ale také dorzálně od ní ležící stomodeální invaginace (jež předznamenává budoucí ústa) a primordium adenohipofýzy, vmezežené mezi stomodeum a dorzální neuroektoderm.

Právě díky studiu diferenciace struktur extrémně anteriorní domény se cementová žláza drápatky stala nejlépe prostudovaným orgánem tohoto typu. Drápatka, jakožto zástupce čeledi pipovitých (Pipidae), je nicméně v mnoha směrech značně odvozeným zástupcem žab – ostatně ani její nepárová kuželovitá cementová žláza příliš nepřipomíná komplexní, obvykle párové struktury s hlubokým centrálním žlábkem, jež nacházíme u ostatních skupin (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005). Mimo samotné žáby variabilita dále narůstá, v důsledku čehož pochopitelně vyvstává nelehká otázka, zda mohou být cementové orgány obratlovců navzájem homologické. Vzhledem k jejich ústřední pozici v morfogenezi struktur hlavy byla představa jejich společného původu, a tedy existence podobného larválního orgánu už u prapředka všech obratlovců, lákavá od samého počátku jejich studia v průběhu 19. století. Už Frankenberger (Frankenberger, 1927) vyslovil názor, že homologické sekretorické žlázy nacházíme u kopinatce (*Branchiostoma*). V souvislosti s cementovými žlázami žab byly opakovaně zmiňovány také ektodermální adhezivní papily sumek (Ascidiacea; např. Frankenberger, 1927; Garstang, 1928; de Bernardi & Fascio, 1994), vznikající v nápadně podobných souvislostech, ventrálně od neurální ploténky a úst (Veeman *et al.*, 2010). Podobně byly homologizovány na první pohled velmi podobné orgány žab a bahníků (Kerr, 1900; Frankenberger, 1927), přestože se zakládají v různých vrstvách embryonální epidermis (Kerr, 1919). Ocasatí obojživelníci nicméně vykazují zcela specifický typ přichytných orgánů, které se zakládají jako nápadně dlouhé tyčinkovité útvary v těsné blízkosti vnějších žaber (Crawford & Wake, 1998). Situace u paprskoploutvých ryb je pak natolik komplikovaná, že dala vzniknout hypotézám sahajícím od představy hlubinné homologie v rámci všech

strunatců (Rétaux & Pottin, 2011), přes homologii s cementovými orgány žab (Groppelli *et al.*, 2003), až po jejich zcela konvergentní vznik postupnou agregací slizových žlázek pokožky do stále komplexnějších adhezivních orgánů (Britz *et al.*, 2000). Poslední zmiňovaná představa byla podpořena popisem několika odlišných typů adhezivních orgánů ryb z řádu Gymnotiformes, přesně odpovídajících postupným stádiím agregace jednobuněčných žlázek ve složitější struktury (Britz *et al.*, 2000).

Zásadní odlišností mezi cementovými žlázami žab a ryb je už jejich samotná pozice, jelikož u ryb se zakládají dorzálně od úst a v podstatě mimo kontext výše popsané extrémně anteriorní domény – namísto nejpřednějšího entodermu se tak bezprostředně pod žlázou nachází vznikající mozek (Minařík, 2011; Obr. 5). Mezi jednotlivými skupinami ryb navíc značně kolísá jejich počet, tvar a embryonální původ, od jediné mediálně uložené vyvýšeniny tvořené svrchní vrstvou pokožky, již nalzáme u piskoře *Misgurnus fossilis* (Cypriniformes: Cobitidae) (Kostomarova, 1991), po tři páry pohárkovitých struktur tvořených odhalenou spodní vrstvou entodermu, jež byly popsány u cichlid (Perciformes: Cichlidae) (Groppelli *et al.*, 2003). Přes zmíněné odlišnosti však zejména na úrovni cytologie a fyziologie vykazují všechny cementové orgány řadu podobností. Vždy se jedná o na hlavě umístěné exokrinní mukózní žlázy, jejichž buňky produkují mukopolysacharidy do vnějšího prostředí ihned po vylíhnutí, respektive již nedlouho před ním, za účelem dočasné adheze (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005; Britz *et al.*, 2000, Groppelli *et al.*, 2003). U všech skupin žlázy vykazují shodnou senzoričnou inervaci některou z větví trigeminálního nervu (Roberts & Blight, 1975; Crawford a Wake, 1998; Groppelli *et al.*, 2003). Jak u žab, tak u ryb bylo navíc prokázáno, že inervace ovlivňuje chování larev spouštěním tzv. *stopping response*, tedy zastavením lokomoce po přichycení k vhodnému substrátu (Roberts & Blight, 1975; Pottin *et al.*, 2010). Stejná funkce se předpokládá u papilárním nervem inervovaných adhezivních orgánů sumky, kde má úspěšné přichycení larvy k substrátu kritický význam pro metamorfózu v přisedlého dospělce (Sotgia *et al.*, 1998). Další nápadné podobnosti mezi adhezivními orgány sumek, žab a ryb byly nalezeny s použitím molekulárních metod. Vznikající žlázy u všech tří skupin vykazují expresi genů *pitx2* a *otx2/5* (Hall & Kerney, 2011; Yoshida *et al.*, 2012), která se zdají pro jejich vznik zcela zásadní (mimo jiné jsou schopny jejich experimentální ektopické indukce v rámci embryonálního ektodermu; Schweickert *et al.*, 2001; Dickinson & Sive, 2007). Zejména pro prvotní vymezení oblasti, v níž se cementová žláza zakládá, je pak důležitá také exprese genu *bmp4* (Gamill & Sive, 2000).

Úvahy o vzájemné homologii cementových orgánů obratlovců komplikuje zejména skutečnost, že se poznatky o nich u žádné ze skupin ani zdaleka neblíží tomu, co je známo u drápatky. Jak bylo naznačeno výše, jen v rámci samotných ryb je situace tak složitá, že je jen těžko možné jejich cementové orgány jednoduše charakterizovat. Další komplikace přineslo zahrnutí bazálních skupin ryb – bichirů, jeseterů a mnohokostnatých (Minařík, 2009 a 2011). J. Graham Kerr již v roce 1907 popsal cementové orgány bichira senegalského (*Polypterus senegalus*) jakožto deriváty předního hlavového entodermu, tedy vnitřní zárodečné vrstvy, jež obvykle tvoří pouze střevo a související orgány (Kerr, 1907). Přestože plně diferencované žlázy splývají s pokožkou a produkují sekret na povrchu hlavy, jejich zcela odlišný zárodečný původ by homologii v klasickém slova smyslu, ať už s ostatními cementovými žlázami ryb či jiných obratlovců, vylučoval (Eycleshymer & Wilson, 1908). Bichir může nicméně představovat překvapivý spojovací článek mezi cementovými orgány žab a ryb. Přestože vznikají v entodermu, zakládají se cementové orgány bichira právě v rámci u drápatky popsané extrémně anteriorní domény, na styku entodermu s anteriorním ektodermem (Minařík, 2011). Stejně jako u kostnatých (Teleostei) se nicméně ústa následně otevírají ventrálně, což vede ke vzniku obdobně lokalizovaných cementových žláz.

Entodermální původ cementových orgánů bichira nicméně není zajímavý jen z hlediska studia tohoto typu orgánů. Existence extrémně anteriorní populace entodermu prvostřeva, která proniká na povrch embrya, kde se následně stává součástí pokožky, je v rozporu s dosavadními představami o vývoji hlavy obratlovců. Kromě toho, že jde o zcela novou morfogenetickou doménu v rámci entodermu, ležící v oblasti daleko před diferencujícími se žaberními štěrbinami, šlo by zároveň o první příklad příspěvku vnitřní zárodečné vrstvy do vnějšího povrchu u obratlovců. Kerrova práce byla nicméně založena na omezeném vzorku embryí, přivezených ze střední Afriky jeho cambridgeským kolegou Johnem S. Budgettem. Sám Budgett zemřel následkem malárie na počátku roku 1904, v den, kdy měl přednést výsledky své práce, a na dlouhou dobu tak šlo o poslední studii, jež měla k dispozici raná embrya této v mnoha směrech nesmírně zajímavé ryby.

Přestože detailní studium morfogeneze cementových orgánů bichira může být klíčem pro pochopení evoluce těchto orgánů v rámci paprskoploutvých ryb (bichiri jsou sesterskou skupinou k Actinopteri, zahrnujícím všechny ostatní paprskoploutvé), ani recentní morfologické studie (Diedhiou & Bartsch, 2009) v tomto směru mnoho nových poznatků nepřinesly. Jakákoli experimentální evidence pro jejich entodermální původ pak chyběla zcela. K vyslovení definitivních závěrů je přitom nutné se alespoň přiblížit úrovni

znalostí, jež jsou k dispozici u drápatky. Právě výsledky této, snad úspěšné snahy jsou hlavní náplní předkládané disertační práce. Rozuzlení situace v rámci paprskoploutvých ryb je zásadním předpokladem pro další úvahy o homologii cementových orgánů – detailní poznání cementových orgánů bichira, případně dalších linií ryb, které se oddělily před vznikem kostnatých, nám v důsledku umožní vyjádřit se k homologii cementových orgánů v rámci Osteognathostomat a nakonec snad i obratlovců jako celku. Může však také naznačit, jaké paralely je možno hledat u našich nejbližších bezobratlých příbuzných.

2. Cíle práce

Předkládaná disertační práce navazuje na předchozí práci diplomovou (Minařík, 2011), v níž byly detailně popsány základní aspekty vývoje cementových orgánů drápatky vodní (*Xenopus laevis*), žebrovníka Waltlova (*Pleurodeles waltli*), bichira senegalského (*Polypterus senegalus*) a piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*), a to pomocí základních histologických a imunohistochemických technik. Cílem doktorského projektu bylo zavedení pokročilejších molekulárně-biologických a zejména experimentálních technik, které by umožnily hlubší porozumění vývojovým procesům, jež ovlivňují formování cementových orgánů, a dovolily tak v závěru posuzovat homologii tohoto typu struktur na co nejširším spektru organizačních úrovní (*levels of biological organization*; Striedter & Northcutt, 1991).

Vzhledem k většímu zacílení na situaci u paprskoploutvých byla v počátcích projektu mimo bichira jako další modelový druh zvolena skalára amazonská (*Pterophyllum scalare*) a díky spolupráci s tuzemskými i zahraničními pracovišti (viz kapitolu 7) posléze také jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) a kostlín mexický (*Atractosteus tropicus*) – zástupci dvou evolučně významných linií, oddělujících se na bázi paprskoploutvých (Near *et al.*, 2012). Tradičně dobře prostudovaná drápatka byla opět použita jako referenční modelový druh, zastupující svaloploutvé (Sarcopterygii). Studium výše uvedených druhů byly v průběhu projektu postupně sledovány následující cíle:

1. Doplnění detailních poznatků o vzniku cementových žláz u studovaných organismů s využitím základních histologických, imunohistochemických, případně proteomických technik. Úvodní komparativní analýza umožní zvolit vhodné modelové druhy pro další fáze projektu.
2. Experimentální ověření entodermálního původu cementových orgánů bichira – vyvinutí a optimalizace vhodné metody *in vivo* fluorescenčního značení entodermu, umožňujícího mapovat příspěvek do hlavových struktur sledováním značených buněk přímo během vývoje embryí a raných larev. Následné testování a aplikace této techniky na další skupiny paprskoploutvých za účelem odhalení ancestrální morfogeneze cementových orgánů ryb.

3. Použití na *in vivo* značení nezávislé techniky vizualizace entodermálního příspěvku do hlavových struktur pomocí počítačové mikrotomografie pro zpřesnění a podpoření dříve získaných experimentálních výsledků. Zasazení morfogeneze cementových orgánů do kontextu diferenciaci hlavového entodermu.
4. Studium exprese genů klíčových pro vznik cementových orgánů metodou RNA *in situ* hybridizace, se zaměřením na situaci u bichira a její srovnání s dosavadními poznatky o vývoji cementové žlázy drápatky.
5. Posouzení stávajících hypotéz o evoluci cementových orgánů obratlovců a jejich případná modifikace na základě nově zjištěných poznatků.

3. Výsledky

3.1 Základní charakteristika cementových orgánů

Vzhledem k tomu, že studium rané embryogeneze bichira a drápatky bylo už náplní předchozí diplomové práce (Minařík, 2011), bylo nutné na počátku projektu doplnit odpovídající znalosti také u nově studovaných druhů, tedy jesetera, kostlína a skaláry. Za tímto účelem byly fixovány detailní vývojové série všech druhů a pořízeny jejich elektronmikroskopické snímky (obr. 1) a vytipována stádia s maximálně vyvinutými cementovými orgány, jež u studovaných druhů stejně jako u dalších skupin obratlovců v pozdních larválních stádiích zanikají. Vhodná, volně žijící stádia byla taktéž barvena pomocí kyseliny jodisté a Schiffova činidla (PAS), které umožňuje selektivně značit mukopolysacharidy a umožnit tak vizualizaci aktivních cementových žláz (obr. 2). PAS barvení bylo negativní u jesetera, u něhož k larvální adhezi nedochází a také většina dostupné literatury uvádí, že na nejpřednějším konci embrya se nachází takzvaná hatching gland (Bolker, 2004; Zeiske et al., 2003; Nagasawa et al., 2016), tedy žláza usnadňující líhnutí enzymatickým rozrušením vaječných obalů, nikoli žláza cementová. V některých publikacích se nicméně s označením žlázy jako cementová či adhezivní setkat můžeme (Pottin et al., 2010).

Výše zmiňovaný entodermální původ cementových orgánů bichira byl studován již v diplomové práci na úrovni histologie a vnější morfologie, jež přinesly další data podporující jejich vznik v rámci vnitřní zárodečné vrstvy. Pro experimentální ověření tohoto předpokladu a následné rozšíření experimentů na další druhy bylo u zástupců bazálních paprskoploutvých (bichira, jesetera a kostlína) nutné zvolit nejvhodnější stádium pro injikaci fluorescenční značky (viz kapitolu 3.3). Za tímto účelem byly provedeny analýzy raných embryí na vibratomových a plastových řezech. Ta u všech druhů ukazují kontinuální dutinu prvostřeva sahající až do oblasti extrémně anteriorní domény, kde hlavový entoderm kontaktuje povrchový ektoderm a kde také dochází k předpokládanému vzniku cementových orgánů (obr. 3A–C). U jesetera je nicméně dutina po většinu vývoje méně prostorná než u zbylých dvou druhů a i u bichira se s postupující neurulací na předním konci výrazně zužuje (obr. 3D). U jesetera ve stádiu farynguly dochází k sekundární kompresi faryngu. Původní dutina prvostřeva zaniká a entoderm tvoří jednolitou masu buněk (obr. 3E–F). Ke vzniku definitivní dutiny trávicí trubice tak

dochází až s otevřením úst podobně, jako je tomu u kostnatých (Soukup et al., 2013). U bichira je na horizontálních řezech jasně patrný bilaterální vznik výchlípek nejpřednějšího entodermu s pomocí kontrakce aktinového cytoskeletu. Prohlubující se výchlípky postupně dávají vznik primordiím cementových orgánů (obr. 3A–F).

3.2 Inervace jako argument pro homologii

Jednou z důležitých charakteristik cementových orgánů je jejich inervace, jež byla opakovaně používána jako argument pro (Pottin et al., 2010), respektive proti homologii (Sauka-Spengler et al., 2002; Crawford & Wake, 1998) v závislosti na tom, který nerv byl u dané skupiny s cementovým orgánem asociován. Shodná inervace jednou z větví trigeminálního nervu byla popsána nezávisle u několika druhů, včetně drápatky (Roberts & Blight, 1975), skaláry (Groppelli et al., 2003), tetry (*Astyanax mexicanus*; Pottin et al., 2010) a žebrovníka (*Pleurodeles waltli*; Fox, 1985). U dalších druhů studovaných v předkládané práci nicméně údaje chyběly.

3.2.1 Srovnání inervace cementového orgánu u studovaných organismů

Za účelem vizualizace nervových vláken byly vybrány larvy bichira, jesetera a kostlína ve stádiu odpovídajícím době líhnutí či starším, kdy je již žláza plně funkční. Imunohistochemické značení protilátkami proti acetylovanému tubulinu umožnilo následně detekci nervových vláken na celých jedincích. Nejjednoznačnější je průběh inervace u bichira, kde je možné jasně identifikovat mohutnou maxilární větev trojklaného nervu (*ramus maxillaris nervi trigemini*, neboli *nervus maxillaris*) směřující z trigeminálního ganglia přímo do cementového orgánu (obr. 6A). Nervy vycházející z kaudálněji ležícího ganglia lícního nervu (*n. facialis*) se inervace cementové žlázy neúčastní. Vibratomové řezy značenými jedinci bichira potvrzují pronikání nervových vláken maxilárního nervu přímo do samotného cementového orgánu. Situace je tak identická s dříve popsanou inervací cementové žlázy drápatky (obr. 6G). Podobný je stav pozorovaný u larvy jesetera, kde část maxilárního nervu směřuje do odpovídající oblasti, vlákna jsou však mnohem méně patrná (obr. 6B). Jak bylo nicméně řečeno výše, u jesetera patrně nedochází k larvální adhezi a tedy ani typické *stopping response*, inervace oblasti cementových orgánů se tak výrazněji rozvíjí až s tvorbou hmatových vousů (Kuratani et al., 2000). Inervace mohutné cementové žlázy kostlína je na první pohled komplexnější (obr. 6C). Při pohledu ze strany je zřejmé, že do oblasti směřují jak vlákna maxilární větve trigeminu, tak těsně pod povrchem ležícího anteriorního nervu postranní čáry. Při pohledu

zdola na otevřená ústa je ve stropu dutiny ústní patrný další pár nervů. Za účelem lepší identifikace původu těchto nervových vláken byli pomocí enzymatické metalografie značení jedinci nasnímáni metodou počítačové mikrotomografie (Micro CT), díky níž bylo možno na 3D rekonstrukcích nervové tkáně určit původ těchto vláken v gangliu sedmého hlavového nervu (n. facialis) (obr. 6D–F), a zároveň potvrdit, že také vlákna anteriorního nervu postranní čáry pronikají přímo k cementovým orgánům.

Je tedy zřejmé, že v rámci bazálních paprskoploutvých panují v inervaci žlázy značné odlišnosti. Ostatně také v rámci obojživelníků se inervace cementových žláz ocasatých (mandibulární větev trigeminu; Fox, 1985) liší od situace u drápatky (maxilární větev trigeminu; Roberts & Blight, 1975). Ačkoli byla odlišná inervace zmiňována jako argument vylučující homologii cementových žláz žab a ocasatých, Sylvie Rétaux ve své práci na cementovém orgánu tetry mexické (*Astyanax mexicanus*) naopak uvádí předpokládanou sdílenou schopnost této žlázy atrahovat trigeminální nervová vlákna jakožto argument podpůrný (Rétaux & Pottin, 2011).

3.2.2 Experimentální testování schopnosti cementové žlázy indukovat růst axonů

U drápatky, kde většina nervových vláken směřuje do kaudální části žlázy, bylo prokázáno, že experimentálním pootočením žlázy o 180° dojde k odpovídajícímu přesměrování vláken anteriorně a transplantace ektopické žlázy do cesty rostoucímu maxilárnímu nervu vede k zastavení růstu axonů a inervaci, což naznačuje aktivní úlohu žlázy v ovlivňování růstu nervových vláken (Hemmati-Brivanlou, 1996). Abych otestoval předpoklad, že cementová žláza aktivně atrahuje nervová vlákna i mimo původní kontext, provedl jsem u embryí drápatky transplantaci ektopické cementové žlázy do ektodermu nad budoucí žaberní oblastí tak, aby ležela mimo původní cílovou oblast maxilární větve trigeminu (obr. 6G–I). Z výsledků je zřejmé, že transplantace ektopické žlázy vede k oddělení nové, postranní větve maxilárního nervu, směřující k ektopické žláze, aniž by byl narušen průběh nervu původního. Pokud je tyto poznatky možné vztáhnout i na další linie, cementová žláza by mohla indukovat růst nervových vláken i tehdy, kdy by se vlivem specifických přestaveb obličejové části hlavy sama ocitla v odlišném kontextu, čímž by mohla být vysvětlena odlišná inervace u jinak vzájemně homologických orgánů.

3.3 In vivo důkaz entodermálního původu cementových orgánů značením pomocí CM-DiI

Největší kontroverze při historických úvahách o homologii vyvolávala možnost odlišného zárodečného původu cementových žláz u některých skupin ryb (podrobně diskutováno v Minařík, 2011). Přestože jako taková homologii nevylučuje, jedná se jistě o jednu z nejzásadnějších výzev ve snaze porozumět evoluci tohoto typu embryonálních orgánů. Zatímco u drápatky je ektodermální původ žlázy pečlivě zdokumentován, nedostatek materiálu bránil získání podobných dat u bazálních paprskoploutvých. Během mého doktorského projektu se podařilo několikrát rozmnožit bichira senegalského, což poskytlo zcela unikátní možnost experimentálně potvrdit předpoklad J. Grahama Kerra o entodermálním původu cementových orgánů této ryby, poprvé publikovaný před více než sto lety (Kerr, 1907).

Pro značení buněk entodermu (tzv. fate-mapping experimenty) jsem použil fluorescenční značku CM-DiI, která byla v podobných studiích opakovaně používána ke značení pomocí fokální injikace přímo do cílové tkáně, kde barví pouze buňky v bezprostředním okolí vpichu. Pro plošné označení entodermu jsem nicméně techniku modifikoval a CM-DiI injikoval přímo do dutiny prvostřeva. Odtud látka volně proniká do buněk entodermálního epitelu. Jelikož výsledný produkt dále membránou neprochází, CM-DiI trvale značí pouze ty buňky, jež mu byly vystaveny po injikaci (obr. 7A, 8).

3.3.1 Experimentální potvrzení entodermálního původu cementových orgánů bichira

Dva výtěry bichira v sezónách 2011 a 2013 umožnily úspěšnou injikaci celkem 25 jedinců ve stádiu neuruly a jejich následnou kultivaci do stádia 25, kdy se cementový orgán otevírá do vnějšího prostředí (za úspěšné byly považovány ty injikace, při nichž nedošlo k nechtěnému označení buněk neurální lišty či mezodermu vlivem špatné orientace jehly). Všech 25 jedinců vykazovalo pozitivní signál v entodermálních tkáních faryngu, případně žloutku (obr. 7). Horizontální řezy naznačují mohutnou expanzi entodermu v hyoidní oblasti, kde se zakládají vnější žábry, za nimiž se otevírá první žaberní štěrbin. Těsně pod cementovými orgány je patrná mediálně expandující populace entodermu, naznačující budoucí pozici úst (obr. 7H). Přímě v cementovém orgánu byl CM-DiI signál potvrzen u 10 jedinců. Relativně nízké procento pozitivně značených cementových orgánů lze vysvětlit rychle postupující neurulací, během níž dochází k postupnému uzavírání prostoru prvostřeva, jež znesnadňuje pronikání CM-DiI do periferních oblastí

(obr. 3D). Reprodukční biologie bichira nicméně neumožňuje získání velkého množství jiker najednou, což komplikuje optimalizaci jakýchkoli experimentálních metod (samice bichira klade jikry postupně během noci a samec oplodňuje každou jednotlivě během komplexního třecího rituálu, výsledkem je několik desítek embryí s různě pokročilým vývojem).

3.3.2 Anteriorní entoderm jesetera přispívá do povrchových struktur okolí úst a báze rostra

Díky spolupráci s kolegy z VÚRH ve Vodňanech se v roce 2012 podařilo zorganizovat první dodávku raných embryí jesetera malého v řádu několika tisíc kusů, slibující více prostoru pro optimalizaci injikační techniky u tohoto druhu. První injikace v Praze prováděl Rolf Ericsson, toho času působící v Natural History Museum v Londýně, už v roce 2011, díky čemuž jsem měl možnost si vyzkoušet techniku injikace neurálních valů před následnou modifikací protokolu pro injikaci prvostřeva bichira. S následnou optimalizací protokolu pro jesetera významně vypomohl Vladimír Soukup, toho času doktorský student v laboratoři Roberta Černého. Od roku 2014 probíhaly dodávky embryí jesetera pravidelně a ve spolupráci s Janem Štundlem se nám podařilo sestavit odchovné aparatury, které usnadnily kultivaci většího množství embryí přímo v chovech katedry zoologie.

Během fate-mapping experimentů bylo následně úspěšně injikováno celkem 117 embryí, jež byla dochována do stádií 36, 38, 40 a 45. Celkem 79 jedinců pak vykazovalo pozitivní signál CM-DiI ve strukturách pozičně odpovídajících v literatuře popisované cementové žláze, respektive hatching gland. Ve stádiu 36 je patrný entodermální příspěvek do rozsáhlé oblasti před vznikajícími ústy (obr. 9A–D). Už při pohledu na neoznačená embrya je patrný vysoký obsah žloutku v buňkách odpovídající části hlavy, což je v souladu s obecně vysokým obsahem žloutku v entodermálním epitelu (viz příloženou publikaci, Extended Data Figure 9). Vibratomové řezy jasně ukazují, že entoderm již v tomto stádiu proniká na povrch a tvoří ventrální epitel preorální oblasti (obr. 10). Ve stádiu 38 se pak v rámci entodermální domény zakládají čtyři jasně viditelné základy hmatových vousů (obr. 9E–H). Entodermální původ těchto smyslových orgánů je dále doložen fluorescenčním signálem v diferenciovaných hmatových vousech ve stádiích 40 a 45 (obr. 9I–P), přestože laterální pár vousů je značen výrazně méně často (7 jedinců, vs. 58 pro pár mediální), což může naznačovat smíšený ekto-entodermální původ laterálních vousů. Entoderm tvoří také výstelku dutiny ústní včetně zubů (obr. 10) a vně

úst dále přispívá do vnějších struktur rtů a široké epiteliální domény v mediální části zakládajícího se rostra, kde je od stádia 45 ohraničen kanálem postranní čáry (obr. 9O, 18), tedy orgánu původem z ektodermální plakody (Gibbs, 2004; Baker et al., 2013), jež do oblasti migruje z prostoru mezi okem a žaberními oblouky.

3.3.3 Kostlín jako další modelový druh a potvrzení ancestrálního zárodečného původu cementových orgánů

V roce 2014 se naskytla unikátní příležitost doplnit vzácný embryonální materiál bichira a jesetera o embrya kostlína a získat tak zástupce poslední linie paprskoploutvých, jež se oddělila před vznikem značně odvozených kostnatých (Teleostei), kteří dnes s přibližně 32 000 druhy tvoří naprostou většinu diverzity ryb. Kostlíni jsou komerčně množeni v mexickém státě Tabasco, kam jsem se nakonec vypravil celkem třikrát v sezónách 2014, 2015 (v doprovodu školitele Roberta Černého) a 2016 a měl tak příležitost zopakovat většinu experimentů do té doby prováděných na bichirech a jeseterech. Injikace entodermu byly úspěšně provedeny u celkem 167 jedinců, z nichž u 155 byl jasně patrný signál také v cementové žláze (obr. 11). Embrya kostlína se vyvíjí na rozměrné dutině prvostřeva, jež je dobře viditelná pod stereomikroskopem a umožňuje okamžitou kontrolu úspěšné injikace (CM-DiI prosvítá přes tenkou vrstvu epitelu a v případě úspěšné injikace je tak v zásadě viditelné pouhým okem; Obr. 11A,B). Kromě cementové žlázy jsou na snímcích celých jedinců patrné prosvítající struktury faryngu - spirakulum a žaberní oblast. Viditelné je také přetrvávající napojení cementového orgánu na zbytek hlavového entodermu (obr. 11F,G,J, 19). Na většině jedinců se též podařilo ukázat entodermální původ vnitřní strany operkula a žaberních lupínek (obr. 11K), jenž je v příkrém rozporu s dřívějšími poznatky, které praví, že žábry všech čelistnatců se zakládají v ektodermu a entodermální žábry se vyskytují pouze u kruhoústých. Až v roce 2017, dříve než se naše zjištění podařilo převést do formy publikace, byla podobná studie nezávisle provedena a zdárně publikována u žraloka (Gillis & Tidswell, 2017) a dánie (Hockman et al., 2017).

Srovnání všech tří studovaných druhů, bichira, jesetera a kostlína, ukazuje některé zásadní skutečnosti. Je zřejmé, že u bazálních paprskoploutvých se na vývoji hlavy podílí unikátní, preorálně lokalizovaná populace buněk entodermu. V rámci obratlovců zcela výjimečná je skutečnost, že tyto entodermální buňky následně pronikají na povrch, kde komunikují s vnějším prostředím. V důsledku se tak jedná o příspěvek vnitřní zárodečné vrstvy do vnějších struktur embrya a jediný zatím zdokumentovaný případ, kdy entoderm

přímo interaguje s ektodermem jinde než v kontextu úst, žaber, či análního otvoru. Zároveň je jasné, že popsany typ morfogeneze představuje situaci ancestrální pro všechny paprskoploutvé.

3.4 Vizualizace hlavového entodermu bazálních paprskoploutvých pomocí počítačové mikrotomografie

Poměrně značná velikost embryí a vysoký obsah žloutku v entodermálních tkáních činí z bichirů, jeseterů a kostlínů ideální objekty pro zobrazení pomocí mikrotomografických metod (Micro CT). Během úvodního testování metodiky na embryích bichira Brianem Metscherem z Vídeňské univerzity se ukázalo, že pomocí kyseliny fosfowolframové (PTA) je možno docílit nejvyššího kontrastu entodermu proti ostatním měkkým tkáním embrya. V rámci bilaterálního programu AKTION financovaného rakouskou vládou jsem v roce 2014 získal stipendium na čtyřměsíční pobyt právě v laboratoři Briana Metschera, kde jsem podrobně analyzoval sérii vývojových stádií bichira (obr. 12), jesetera (obr. 13) i kostlína (obr. 14) od neurulace po vylíhnutí. Z těchto jsem posléze vybral klíčová stadia pro vývoj hlavového entodermu a z něj odvozených cementových orgánů a s pomocí softwaru Amira vytvořil 3D vizualizace hlavového entodermu (obr. 15A).

Přestože CM-DiI značení je vysoce specifickou metodou identifikace entodermu, signál není ani zdaleka homogenní a neumožňuje tak zobrazit hlavový entoderm jako celek. Vzhledem k velikosti a opacitě embryí je bez použití histologických technik vyloučeno jakékoli zobrazení vnitřních struktur hlavy a příspěvek do struktur vnějších je patrný až těsně před líhnutím embryí. Micro CT naproti tomu umožňuje identifikovat entoderm na základě vysoké denzity žloutkových granulí už od velmi raných stádií, zatímco v době líhnutí rozlišovací schopnost vlivem resorpce žloutku postupně klesá. Právě raná stadia jsou však klíčová pro pochopení morfogeneze cementových orgánů v kontextu hlavového entodermu a Micro CT tak představuje ideální nástroj.

3.4.1 Cementové orgány bazálních paprskoploutvých vznikají z předústního střeva

Embrya bichira se již záhy po neurulaci ve stádiu 22 vyznačují přítomností nepatrných vyvýšenin na předním konci hlavy. Micro CT rekonstrukce ukazuje, že se jedná o bilaterální výchlípky, jež jsou jednoznačným pokračováním nejpřednějšího konce střeva a zakládají se dlouho před diferenciací jednotlivých kaudálně situovaných žaberních výchlipek (obr. 15B,C). Ve stádiu 23, kdy je již viditelná spirakulární výchlípka a

expandující hyoidní entoderm v oblasti vzniku vnější žábry, získávají anteriorní výchlipky střeva kyjovitý tvar (obr. 15D) a ve stádiu 25 se již viditelně otevírají do vnějšího prostředí jakožto funkční cementové žlázy (obr. 15E). Oblast vzniku úst se přitom nachází kaudálně a ventrálně od těchto výchlipků. Na základě jejich pozice budeme dále tyto výchlipky nazývat předústním střevem (preoral gut, obr. 17).

U jesetera je ve stádiu 25 situace nápadně podobná, nicméně výchlipka předústního střeva je nepárová (obr. 15H). Ve stádiu 27 se diferencují tři páry žaberních výchlipků a nad předústním střevem je patrná migrující adenohipofýza (obr. 15I). Ve stádiu 30 již předústní střevo nabývá deltovitého tvaru předznamenávajícího podobu entodermální domény na bázi rostra, popisované na základě CM-DiI značení a patrné v pozdějších stádiích i na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu (obr. 15J,K). Předústní střevo si nadále zachovává spojení se zbytkem hlavového entodermu a ústa se později otevírají pod místem největšího zúžení (obr. 15J, 17).

Přestože u kostlína se předústní střevo zakládá ve stádiu 17 obdobně jako u jesetera, tedy v podobě pŕlměsíčitě nepárové vyvýšeniny (obr. 15M), velmi záhy se na jejich stranách formují mohutné výchlipky, jež ve stádiu 18 expandují dorzálně (obr. 15N). Ve stádiu 19 se pak stáčí zpět do mediální roviny a dávají tak vzniknout podkovovitému cementovému orgánu, který se následně otevírá do vnějšího prostředí jakožto nepravidelný shluk jednotlivých sekretorických žlázek. V témže stádiu je již dobře viditelná také spirakulární výchlipka a diferencující se žaberní oblast. Konkrétní uspořádání otvorů cementových orgánů není bilaterálně symetrické, a to ani v rámci jedince (obr. 15O,P). Celý adhezivní disk zůstává na rozdíl od bichira po celou dobu v kontaktu se stropem ústní dutiny (obr. 16) v jasně preorální pozici (obr. 17).

3.4.2 Překryv mikrotomografických dat s CM-DiI značením potvrzuje výsledky fate mapping experimentů

Mikrotomografická data významným způsobem doplňují poznatky získané in vivo fate-mapping experimenty. Poslední nasnímaná stádia přibližně odpovídají nejmladším stádiím, jež byla analyzována po značení CM-DiI a z výsledků je jasně patrná identita studovaných struktur nezávisle na použité technice. Překryv získaných dat je jasně patrný na snímcích embrya kostlína ve stádiu 22, kde je jak v případě CM-DiI značení, tak Micro CT rekonstrukce dobře viditelná kontinuita entodermu a jeho příspěvek do cementových orgánů, ale také kaudálně ležící struktury faryngu včetně vyvíjející se žaberní oblasti (obr. 19). Přestože tedy Micro CT neumožňuje snadnou identifikaci entodermu v pozdějších

stádiích, poskytuje unikátní data o jeho rané dynamice. Ta jasně dokládají existenci předústního střeva jako svébytné entodermální domény, jež se zásadním způsobem účastní morfogeneze hlavy u všech tří studovaných linií bazálních paprskoploutvých a v závěru embryonálního vývoje proniká na povrch, kde později přispívá do vnějších struktur hlavy (obr. 17).

3.5 Přes odlišný zárodečný původ cementové žlázy sdílí expresi klíčových genů

Výše uvedená zjištění o zárodečném původu cementových orgánů bazálních paprskoploutvých v rámci entodermy předústního střeva v důsledku vedla k přeměrování hlavní pozornosti disertačního projektu směrem k uvedení nově popsané domény do kontextu ontogeneze hlavy obratlovců. Že je detailní studium nově popsané domény, z níž cementové orgány vznikají, nutné také pro následné posouzení jejich homologie napříč zárodečnými vrstvami, je nasnadě. Nicméně alespoň pro předběžné potvrzení, že se jedná o struktury nějakým způsobem spřízněné se žlázami ektodermálního původu, je nutné úvodní srovnání s cementovou žlázou drápatky. Na následujících řádcích je popsána analýza exprese klíčových genů u bichira, která byla součástí doktorského projektu, a stručně také analýzy jesetera a kostlína, jež probíhaly v průběhu dokončování příloženého manuskriptu a jedná se o výsledky společného úsilí kolegů Jana Štundla, Petra Fabiana a Davida Jandzíka. Výsledky týkající se exprese *sox17* či *foxe4* diskutované v kapitole 4 jsou pak v plně šíři popsány v příložené publikaci (Minarik et al., 2017).

Pro vznik cementové žlázy drápatky je klíčová koexprese transkripčních faktorů *Pitx2* a *Otx2* (Dickinson & Sive, 2007), druhý z genů je však u ocasatých nahrazen jeho paralogem *Otx5* (Sauka-Spengler et al., 2002), a stejně tomu je i v případě bichira (Suda et al., 2009). Ventrálně od cementové žlázy je pak exprimován gen *Bmp4*, jenž ve vysokých koncentracích iniciaci žlázy inhibuje, nicméně nižší koncentrace jsou pro její vznik permissivní a nesou důležitou poziční informaci pro indukci vznikajícího primordia (Dickinson & Sive, 2007). Závislost cementové žlázy drápatky na *Bmp4*, *Pitx2* a *Otx* a podobná situace u kostnatých (Pottin et al., 2010) a sumek (Yoshida et al., 2012) podpořila představu, že jsou ektodermální cementové orgány obratlovců homologické (Rétaux & Pottin 2011).

Cementové orgány bichira, jak bylo ukázáno výše, vznikají z entodermu. Poněkud překvapivě však exprimují jak již v literatuře dříve popsany *otx5* (Suda et al., 2009), tak také *pitx2*. Exprese *pitx2* počíná ve stádiu neuruly v podobě půlměsíčitě domény pod předním okrajem anteriorního neurálního valu (obr. 21A,B). V pozdějších stádiích přetrvává v orální oblasti mezi vznikajícími cementovými orgány a na jejich mediální straně (obr. 21C,D,G). Přestože je zřejmé, že *pitx2* není exprimován v cementových orgánech jako celku, vibratomové řezy ukazují, že ektodermální expresní doména v orální oblasti přechází do entodermu a v rámci něj expanduje laterálně do proximální části výchlipek předústního střeva (obr. 21E,F). Po oddělení cementových orgánů od zbytku entodermu *pitx2* zůstává exprimován v jejich vnitřní části (obr. 21H–J). *Bmp4* stejně jako u drápatky chybí v orální oblasti a naproti tomu je exprimován v ektodermální doméně ventrálně těsně sousedící s primordií cementových orgánů, tedy v souladu s představou, že jeho expresní doména vymezuje dorzálně ležící oblast epitelu, v níž je posléze iniciován vznik cementové žlázy (obr. 21K–N). Výše charakterizovaná trojice transkripčních faktorů společná ektodermálním žlázám žab, kostnatých a sumek je tak v zásadě přítomna i u cementových orgánů bichira. Příslušná oblast nejanteriornějšího entodermu předústního střeva přitom tvoří entodermální komponentu extrémně anteriorní domény popsané u drápatky – nachází se v přímém kontaktu s ektodermem v oblasti vzniku cementové žlázy, úst a adenohipofýzy (obr. 21O,P). Získané výsledky naznačují, že v evoluci cementových orgánů vznikajících v rámci extrémně anteriorní domény mohlo dojít k přesunu kompetence k tvorbě sekretorických buněk z ektodermu do těsně sousedícího entodermu, případně naopak.

Jak ukazují data získaná spoluautory přiložené publikace, podobný charakter exprese lze nalézt i u kostlína a jesetera (u kterého se nicméně do publikování studie nepodařilo vytvořit spolehlivou ISH próbu pro *pitx2*). Klíčová je nicméně exprese některých entodermálních markerů, jež poskytuje dodatečnou podporu entodermálnímu původu primordií cementových orgánů, respektive předústního střeva (obr. 23) a umožňuje následné srovnání této entodermální domény s obdobnými strukturami v dalších liniích obratlovců. Jelikož entodermální původ cementových orgánů je na základě zde představených dat zjevně ancestrální pro všechny paprskoploutvé, je pro budoucí studium cementových žláz obratlovců klíčové zejména srovnání jejich vzniku právě mezi bazálními paprskoploutvými a drápatkou, s cílem porozumět mechanismům přesunu jejich iniciace mezi zárodečnými vrstvami.

4. Seznam vyobrazení

| | |
|--|------|
| Obr. 1: Vnější morfologie hlavy jesetera, kostlína a skaláry | I |
| Obr. 2: PAS barvení cementových orgánů | I |
| Obr. 3: Extrémně anteriorní doména u bazálních paprskoploutvých | II |
| Obr. 4: Morfogeneze přední stěny archentera u bichira | II |
| Obr. 5: Poloha cementových orgánů vůči ústům u studovaných druhů | III |
| Obr. 6: Inervace cementových orgánů | III |
| Obr. 7: <i>Fate-mapping</i> experiment – bichir | IV |
| Obr. 8: <i>Fate-mapping</i> experiment – jeseter (I) | V |
| Obr. 9: <i>Fate-mapping</i> experiment – jeseter (II) | V |
| Obr. 10: <i>Fate-mapping</i> experiment – jeseter (III) | VI |
| Obr. 11: <i>Fate-mapping</i> experiment – kostlín | VI |
| Obr. 12: Mikrotomografické snímky vývojové série bichira | VII |
| Obr. 13: Mikrotomografické snímky vývojové série jesetera | VIII |
| Obr. 14: Mikrotomografické snímky vývojové série kostlína | IX |
| Obr. 15: Vizualizace hlavového entodermu pomocí Micro CT | X |
| Obr. 16: Spojení cementové žlázy a ústní dutiny u kostlína | X |
| Obr. 17: Pozice předústního střeva vzhledem k ústům | XI |
| Obr. 18: Morfologie báze rostra jesetera | XI |
| Obr. 19: Srovnání mikrotomografického zobrazení s CM-DiI značením <i>in vivo</i> | XI |
| Obr. 20: Vizualizace hlavového entodermu jesetera v kontextu dalších embryonálních struktur | XI |
| Obr. 21: Expres klíčových transkripčních faktorů v cementových orgánech bichira | XII |
| Obr. 22: Relativní umístění cementových orgánů bichira vzhledem k faryngeálním obloukům | XIII |
| Obr. 23: Analýza genové exprese v primordiu předústního střeva | XIII |
| Obr. 24: Přehled typů cementových orgánů strunatců | XIV |
| Obr. 25: Morfogeneze hlavového entodermu obratlovců | XIV |
| Obr. 26: Migrace primordia adenohipofýzy u jesetera | XV |
| Obr. 27: Výskyt předústního střeva a cementových žláz u druhoústých | XV |
| Obr. 28: Předústní střevo jako znak společný všem obratlovcům | XVI |

5. Diskuse

5.1 Homologie cementových orgánů ve světle nových poznatků

Výsledky detailně popsané v předchozí kapitole nás nutí pohlížet na evoluci cementových orgánů ze zcela nové perspektivy. Cementové orgány byly doposud chápány jako projev hluboce sdílené schopnosti hlavového ektodermu obratlovců vytvářet tento typ adhezivních žláz (Rétaux & Pottin, 2011), pokud byly vůbec považovány napříč obratlovci za homologické. Zde prezentovaná data nicméně jasně ukazují, že u tří zástupců bazálních linií paprskoploutvých vznikají obdobné struktury z entodermu, konkrétně z takzvaného předústního střeva. Případnou homologii a tedy evoluční kontinuitu mezi modelovými ektodermálními žlázami drápatky a entodermálními žlázami bazálních paprskoploutvých je tak nově nutno hledat v mnohem širším kontextu ontogeneze hlavy.

5.1.1 Homologické struktury mohou vznikat z různých zárodečných vrstev

Experimenty provedené na cementové žláze drápatky jasně ukazují vývojovou plasticitu senzoričké inervace, jež byla standardně používána jako argument pro (Rétaux & Pottin, 2011), respektive proti homologii cementových žláz (Crawford & Wake, 1998). Přestože z důvodu nedostatku embryonálního materiálu a náročnosti transplantace anteriorního entodermu u ryb zatím stejný experiment nebyl proveden u bazálních paprskoploutvých, alespoň na příkladu drápatky je zjevné, že žláza rostoucí axony aktivně atrahuje (obr. 6) a v závislosti na její poloze může být inervace zajišťována odlišnou větví daného nervu. Pokud je tomu tak i u dalších skupin, mohla by namísto konkrétní podoby inervace na morfologické úrovni být homologická právě schopnost žlázy indukovat růst axonů na úrovni mezibuněčné signalizace. Uvažujeme-li podobné posuny na dalších úrovních regulace obratlovčí ontogeneze, rozdílný zárodečný původ studovaných struktur nakonec homologii neodporuje tolik, jak se na první pohled mohlo zdát.

Představa homologie napříč zárodečnými vrstvami není ostatně ničím novým a pro příklad nesporně homologických struktur, které mohou vznikat ze dvou různých zárodečných vrstev, postačí sáhnout do literatury tuzemského původu. Již v roce 2008 byl popsán duální ekto- a entodermální původ zubů u axolotla (Soukup *et al.*, 2008).

Zárodečný původ zubů se lišil i v rámci jednotlivých zubních polí a je tedy zřejmé, že v adekvátním vývojovém kontextu (zde odontogenní mezenchym původem z neurální lišty) je epitel bez ohledu na zárodečný původ schopen diferenciaci ve vysoce specializované ameloblasty, jež dávají vzniknout naprosto stejnocenným zubům. Precizní *fate-mapping* experimenty navíc autorům umožnily prokázat existenci jednotlivých zubů s epitelem smíšeného ekto-entodermálního původu (Soukup *et al.*, 2008). Také dříve provedená studie zárodečného původu chuťových pohárků u myši ukázala, že i tyto sensorické orgány vznikají v lokálním epitelu bez ohledu na jeho zárodečný původ (Stone *et al.*, 1995). Homologie tedy v jednotlivých případech zjevně překračuje hranice zárodečných vrstev, a pro její posouzení je tak nutné brát v úvahu také další organizační úrovně, na nichž se vývoj a evoluce mnohobuněčného života odehrává.

Pro podobné případy, kdy je bez viditelných fenotypových změn na plně vyvinutém orgánu možno prokázat posun v souvisejících vývojových procesech, ať už na úrovni molekulární signalizace, morfogeneze či zárodečného původu, se v nedávné době vžilo označení *developmental system drift* (True & Haag, 2001). Ačkoliv se dá v souladu s klasickým pojetím homologie očekávat, že morfogeneze homologických orgánů a její genová regulace bude u příbuzných linií spíše stabilní, v situacích kdy u jedné z linií dojde k zásadním přestavbám rané embryogeneze a s tím souvisejícím změnám tkáňového kontextu, může být posun souvisejících vývojových mechanismů pro zachování původního fenotypu nevyhnutelný. Z fylogenetického hlediska je v takovém případě zásadním vodítkem, na nějž lze mapovat další úrovně, přítomnost znaku v průběhu evoluce dané linie, bez ohledu na zdánlivou závažnost jeho proměn.

5.1.2 Cementové orgány bazálních paprskoploutvých vznikají v rámci nově popsané domény předústního střeva

Zdá se, že cementové orgány ryb představují příklad právě takového vývojového driftu. Předkládaná práce jasně ukazuje na vznik cementových orgánů bichira a kostlína, funkčně identických s cementovou žlázou žab, v rámci entodermu extrémně anteriorní domény (obr. 15, 21) – nikoli v ektodermu, jak je tomu u modelové drápatky. Přesto tyto žlázy jeví sdílené charakteristiky na úrovni tkáňového kontextu v době nejranější iniciace, exprese klíčových transkripčních faktorů *otx/pitx/bmp* (obr. 21), inervace trojklaným nervem (obr. 6), či sekrece mukopolysacharidů sloužících k vlastní adhezi (obr. 2). Prezentované výsledky nicméně také ukazují na klíčovou roli zcela unikátních morfo-genetických procesů v rámci nově charakterizované extrémně anteriorní

entodermální domény, již v této práci označujeme jako předústní střevo (*preoral gut*). U jesetera navíc táž doména zjevně nedává vzniknout cementovým orgánům, nýbrž žláze usnadňující rozrušení vaječných obalů při líhnutí (Nagasawa *et al.*, 2016). Otázka homologie cementových žláz paprskoploutvých ryb, natož pak obratlovců obecně, se tak na základě provedené detailní studie jejich tří bazálních linií zdá být mnohem komplexnější, než by tomu bylo při dříve uvažovaném jednotném ektodermálním původu těchto orgánů (Rétaux & Pottin, 2011). Morfogeneze této nově popsané domény zároveň představuje tak zásadní modifikaci ontogeneze hlavy, že je pro posouzení homologie orgánů vznikajících v jejím rámci zcela zásadní zasadit do kontextu evoluce obratlovců nejprve předústní střevo samotné.

5.2 Předústní střevo v kontextu evoluce obratlovců

Předkládaná detailní charakteristika předústního střeva bazálních paprskoploutvých jakožto nové domény v morfogenezi hlavového entodermu mění dosavadní pohled na nejranější vývoj hlavy hned na několika úrovních fylogeneze obratlovců. Především vyvstává otázka po identifikaci odpovídajících struktur u kostnatých (Teleostei), u nichž jak známo cementové orgány vznikají v pokožce přední či svrchní části hlavy, nikoli z entodermu (Minařík, 2011). Zásadní změny v gastrulaci u kostnatých vedly mimo úplnou redukci archentera také k výrazně užší integraci entodermu a mezodermu, jež během gastrulace migrují jako jednotná populace buněk mezentodermální identity, a až do jejího skončení jsou tak v zásadě přítomny pouze dvě zárodečné vrstvy namísto tří – tzv. epiblast (ektoderm) a hypoblast (mezentoderm) (Kimmel *et al.*, 1995). Přestože jsou kostnatí reprezentováni jedním z nejlépe probádaných zvířecích modelů, dániem pruhovaným (*Danio rerio*), je tak poměrně obtížné nalézt vývojový protějšek předústního střeva tak, jak bylo popsáno u bichirů, jeseterů a kostlínů. Redukcí archentera pochopitelně zaniká přední stěna střeva, stejně jako morfologicky jasně definovatelná extrémně anteriorní doména jako místo kontaktu ektodermálního a entodermálního epitelu, v důsledku čehož se i morfogeneze samotných primárních úst odvíjí zcela jinak než u modelové drápatky (Soukup *et al.*, 2013; obr. 25). Jediným náznakem existence alespoň rudimentárního předústního střeva je tak přítomnost takzvaného *polsteru*.

5.2.1 Žláza rozrušující vaječné obaly u kostnatých je homologem předústního střeva

U dána a také u medaky (*Oryzias latipes*) byla detailně popsána anteriorně lokalizovaná mezentodermální struktura, jež svým tvarem a pozicí jasně upomíná na raná stádia vývoje předústního střeva jesetera (Inohaya *et al.*, 1995; Swindell *et al.*, 2008). Tato populace buněk, nazývaná také *polster*, dává později vzniknout takzvané *hatching gland*, žláze sloužící k rozrušení zárodečných obalů při líhnutí. V terminologii embryologie kostnatých se sice jedná o derivát axiálního mezentodermu, konkrétně buněčné populace označované jako prechordální destička (Swindell *et al.*, 2008), avšak užití tohoto termínu napříč obratlovci není zdaleka jednotné (viz níže).

Přestože je ve stádiu farynguly tato žláza zatlačena nad vyvíjející se perikardiální dutinu, tedy v opačném směru, než v jakém expanduje předústní střevo jesetera (Nagasawa *et al.*, 2016), výchozí pozice na nejpřednějším konci střeva mezi žloutkem a vznikající mozkovou tkání je u obou skupin identická. Že by se mohlo jednat o homologické struktury naznačuje jak výše diskutovaná funkce orgánu u jesetera (viz kapitulu 3.1), tak zejména exprese týchž genů, jež se podílejí na její diferenciaci a funkci – u dána jde zejména o *foxe3*, který je funkčním homologem *FoxE4* drápatky (Shi *et al.*, 2006). Stejný gen je pak exprimován právě v primordiu předústního střeva jesetera a kostlína (obr. 23). Jak u obojživelníků, tak u paprskoploutvých je během raného vývoje *hatching gland* exprimován gen *klf17* a v pozdějších stádiích gen *he* zodpovědný přímo za syntézu enzymů rozrušujících vaječné obaly. Zatímco však u obojživelníků a bichira se primordium žlázy vytváří v ektodermu a vyznačuje se souběžnou expresí *pax3*, u ostatních paprskoploutvých se přesouvá do nejanteriornějšího mezentodermu a na jejím vývoji se podílí gen *foxa3* (Nagasawa *et al.*, 2016).

Vývojové modifikace *hatching gland* po oddělení paprskoploutvých od společného předka s obojživelníky názorně ilustrují komplexní přestavby v oblasti extrémně anteriorní domény, jež se odehrály během evoluce ryb. Ještě u bichira existují paralelně dvě domény exprese *klf17* a *he*, přičemž jako *hatching gland* zřejmě slouží ta ektodermální, vyznačující se navíc expresí *pax3*, zatímco doména v nejanteriornějším entodermu exprimující navíc *foxa3* topograficky odpovídá přední stěně archentera, v rámci níž se zakládají cementové orgány. U jesetera již exprese *pax3* mizí a *hatching gland* se vyvíjí přímo z primordia předústního střeva exprimujícího *foxa3*. *Polster* kostnatých se zakládá shodně v *klf17*- a *foxa3*-pozitivním nejanteriornějším mezentodermu, liší se však schopností migrovat ventrálním směrem (Blanco *et al.*, 2007),

v důsledku čehož se výsledná pozice *hatching gland* jesetera a kostnatých liší (Nagasawa *et al.*, 2016). Z dostupné literatury je nicméně zřejmé, že v případě předústního střeva jesetera a *polsteru* kostnatých se jedná o tutéž strukturu a její redukce na masu mezentermálních buněk je důsledkem absence archentera u druhé zmiňované skupiny. Popisovaný proces je konečně v náznaku přítomen už u jesetera, kde se v důsledku sekundární komprese prvostřeva charakter výchlípku mění z epiteliálního váčku v pouhou ztluštěninu klínovitého tvaru (obr. 3, 25).

5.2.2 Předústní střevo existovalo u společného předka paprskoploutvých a svaloploutvých

Výsledky předkládané v této práci jasně dokládají, že předústní střevo tak, jak bylo popsáno u bichira, jesetera a kostlína zjevně představuje ancestrální typ morfogeneze nejanteriornější části střeva pro všechny žijící paprskoploutvé ryby (obr. 27,28). Tento poznatek má zásadní význam pro pochopení vývoje hlavy obratlovců, jelikož přítomnost tohoto znaku u všech tří studovaných linií posouvá jeho původ do období na přelomu devonu a karbonu, kdy žil poslední předek dnešních paprskoploutvých (Giles *et al.*, 2017). S tím se ovšem hluboko do historie obratlovců posouvá také otázka po původu předústního střeva – to, co se ještě na počátku minulého století mohlo jevit jako prazvláštní apomorfie jediné bazální linie, tak ve světle nových zjištění zřejmě poukazuje na vývojové procesy, jež se mohly odehrávat během ontogeneze našich dávných obratlovčích předků.

Logickým dalším krokem je tak analýza situace u svaloploutvých (Sarcopterygii), kteří jakožto sesterská skupina k paprskoploutvým zahrnují značně rozmanité linie od rybovitých lalokoploutvých (Coelacanthiformes) a bahníků (Dipnoi) přes obojživelníky (Amphibia) po obratlovce specializované na život na souši (Amniota). Dostupné znalosti o raném vývoji nejpřednějšího entodermu u těchto skupin jsou nicméně značně fragmentární. U drápatky, modelového zástupce obojživelníků, po preorální expanzi extrémně anteriorní domény není žádné známky. Zdánlivě typické předústní střevo bylo nicméně popsáno na histologických řezech orální oblasti žáby ocasatky *Ascaphus truei* (Reiss, 1997), zástupce bazální čeledi Ascaphidae. Přestože detailní popis jeho nejranějšího vývoje není k dispozici, je zřejmé že se v době otevírání úst jedná o plochou entodermální výchlípku vmezeřenou mezi mozek a strop stomodea, svou polohou odpovídající předústnímu střevu jesetera. U ocasatých obojživelníků byla dynamika ektoentodermálních interakcí popsána podrobně na příkladu axolotla (Soukup *et al.*, 2008),

nicméně přes prokázaný smíšený ekto-entodermální původ některých jeho orálních struktur se zjevně předústní střevo nevytváří.

Přítomností nepárové, mediálně uložené výchlipky v přední části střeva se však vyznačuje celá řada amniot. Poprvé byla tato struktura popsána americkým embryologem Albertem Seesselem v roce 1877 u kuřete (Seessel, 1877), nicméně dobře známa je z pozdějších prací i u savců (například Rand, 1917), kde je již podle svého objevitele nazývána Seesselovou výchlipkou (v literatuře někdy též chybně Sesselovou). Nejanteriornější část entodermu, z níž výchlipka vzniká, je zásadním organizérem vývoje mozku (Pera & Kesse, 1997; Muenke & Beachy, 2000), stejně jako *Hox*-negativních buněk neurální lišty a jejich skeletálních derivátů (Couly *et al.*, 2002). Pozdější vývoj byl detailně popsán u kuřete a křepelky, kde byla výchlipka zasazena do souvislosti s dalšími strukturami předního konce hlavy. Anteriorně od místa, kde notochord přechází plynule v mezenchymatický prechordální mezoderm, vzniká ztlustění entodermálního původu, označovaná jako prechordální destička (srov. situaci u kostnatých). Přímou v jejím středu se formuje nápadný váček tvořený kolumnárními buňkami entodermálního epitelu – Seesselova výchlipka. Prechordální destička tvořící v těchto místech strop archentera pak pokračuje dále dopředu, kde dává vzniknout prosencephalickému mezenchymu, vmezeřenému mezi nervovou trubicí a ventrální ektoderm (Seifert *et al.*, 1993). Zjevně entodermální původ těchto extrémně anteriorních buněčných populací (Stern, 2004) nápadně upomíná na shodně lokalizované předústní střevo ocasatky i bazálních paprskoploutvých (obr. 28).

U savců se jasně patrná epiteliální výchlipka zakládá v anterodorzální části nej přednějšího entodermu a s pokračujícím vývojem orální oblasti se dostává do těsného sousedství Rathkeho výchlipky, vznikající z ektodermu vchlipujícího se stomodea (Schwind, 1928), zaujímaje také extrémně anteriorní pozici. Související literatura je nicméně značně nejednotná v rozlišování mezi termíny prechordální mezoderm a prechordální destička, stejně jako v otázce přiřazení Seesselovy výchlipky jedné ze souvisejících zárodečných vrstev. Obvyklá interpretace je tak historicky spíše opačná než jak bylo výše popsáno u kuřete – prechordální destička jakožto derivát axiálního mezodermu přispívá do anterodorzální stěny střeva, v rámci níž se následně tvoří Seesselova výchlipka (Parker, 1917; Aasar, 1931; Aoto, 2009). Z výše uvedeného je zřejmé, že samotné histologické analýzy jsou pro detailní pochopení dynamiky anteriorního mezentodermu amniot nedostatečné. Na rozdíl od dána nejsou bohužel k dispozici analýzy genové exprese, jež by se specificky zaměřovaly na geny typické pro

jednotlivé fáze vývoje Seesselovy výchlipky amniot. Přinejmenším v nejranějších stádiích však byla doložena exprese *Sox17* (Chapman *et al.*, 2001; Hassoun *et al.*, 2010), klasického markeru definitivního entodermu (Alexander & Stainier, 1999), jenž je exprimován také v primordiu předústního střeva jesetera (obr. 23).

V kontextu zde prezentovaných poznatků o vývoji nejanteriornějšího střeva bazálních paprskoploutvých se tedy jeví pravděpodobnější hypotéza formulovaná u kuřete, která spolu s existencí předústního střeva u žaby ocasatky nahrává představě, že předústní střevo existovalo u společného předka dvou druhově nejbohatších linií obratlovců, paprskoploutvých a svaloploutvých. Zatímco u terestrických obratlovců předústní střevo představuje dočasnou strukturu skrytou uvnitř vznikající hlavy, u paprskoploutvých se jedná o první jasně diferencovaný orgán, jenž proniká na povrch embrya, kde zastává úlohu cementové žlázy (respektive *hatching gland* v případě jesetera). Zda mohutná anteriorní expanze střeva původně tvořila integrální součást vývoje povrchových struktur prvních obratlovců, nebo tuto aktivní úlohu ve vývoji získala sekundárně až se vznikem paprskoploutvých, může napovědět situace u dalších linií obratlovců.

5.2.3 Charakter expanze předústního střeva obratlovců je ovlivněn typem rýhování vajíčka

Nápadně podobným vývojem jako u amniot prochází anteriorní struktury vyvíjející se hlavy taktéž u žraloka *Scyliorhinus torazame* (Adachi & Kuratani, 2012; Adachi *et al.*, 2012), kde se viditelně diferencuje slepě zakončené předústní střevo, jehož strop opět tvoří nápadná prechordální destička, jež kaudálně plynule přechází v notochord – na rozdíl od kuřete je tedy kontinuita entodermu a mezodermu v nejanteriornějším pólu embrya u žraloka uchována poměrně dlouho, což pochopitelně komplikuje jasné vymezení zárodečného původu jednotlivých struktur. Prechordální destička nicméně expanduje podél báze mozku stejně, jako je tomu u předústního střeva jesetera (obr. 28), pouze s tím rozdílem, že pokud je známo, neproniká na povrch rostra. Ve stádiu 18 se prechordální destička v oblasti vzniku hypothalamu dělí na anteriorní část, která později zaniká, a posteriorní část, v níž se tvoří premandibulární hlavové kavity (ty se tvoří také u jesetera, nachází se však mnohem více kaudálně a nejeví žádnou spojitost s expanzí předústního střeva (obr. 20). Stejně jako je tomu u bazálních kostnatých (obr. 21, Extended Data Figure 7 v příložené publikaci), i u žraloka je v epitelu předústního střeva exprimován gen *pitx2* (Adachi *et al.*, 2012), známý už z extrémně anteriorní domény

drápatky. Expresce nicméně chybí v anteriorní části prechordální destičky. Poznatky o expresi entodermálních markerů *sox17* a *foxe4* bohužel u žraloka k dispozici zatím nejsou. Stejně je tomu u jediného zástupce bezčelistných, u kterého máme alespoň základní popis anteriorně expandující prechordální destičky, sliznatky *Eptatretus burgeri*. K dispozici je stejně jako u žraloka zatím pouze 3D rekonstrukce několika vývojových stádií, jež naznačuje, že epiteliální strop prvostřeva před notochordem dává vznik podlouhlé dorzální výchlípce, která se později dělí na dva úzké tyčinkovité útvary (Oisi *et al.*, 2013), než ve stádiu 45 zcela vymizí, aniž by dala vzniknout jakýmkoli adultním strukturám (přechodná povaha derivátů předústního střeva je ostatně nápadná už u cementových orgánů bichira a kostlína – jediným druhem, u nějž tato struktura přispívá do adultních orgánů, se tak zdá být jeseter; obr. 9, 18).

Přijmeme-li homologii předústního střeva bazálních paprskoploutvých s prechordální destičkou žraloků a amniot (obr. 28), již by naznačovala jejich vzájemná exkluzivita v rámci fylogeneze obratlovců (obr. 27), identická pozice v rámci vyvíjející se hlavy, iniciace v *pitx*-pozitivním entodermu extrémně anteriorní domény (obr. 21) a následná expanze rostrálním směrem mezi spodinu mozkovny a strop vznikajícího stomodea (obr. 15), je nutné vysvětlit rozdíly v jejich morfogenezi. Zatímco předústní střevo bazálních paprskoploutvých typicky vzniká ve formě epiteliálních výchlípek, jejichž lumen si alespoň po část vývoje zachovává kontinuitu s dutinou prvostřeva (obr. 25), prechordální destička expanduje jako jednolitá masa buněk odmigrovavších z původně epiteliálního stropu nejanteriornější části střeva, která v extrémním případě amniot získává až charakter volného mezenchymu (Seifert *et al.*, 1993). Pravděpodobné vysvětlení skýtá vliv množství žloutku na celkový rozvrh raného vývoje embrya. Linie, u nichž nejanteriornější entoderm dává vznik pravým epiteliálním výchlípkám, se vyznačují mezolecitálními vajíčky a (s výjimkou kostlína) holoblastickým rýhováním, jež vedou k internalizaci žloutku a vzniku prostorného archentera s jasně definovanou epiteliální výstelkou entodermálního původu (obr. 3, 12–14). Naproti tomu sliznatky, žraloci, kostnatí i amniota prodělávají v důsledku většího množství žloutku v telolecitálním vajíčku odvozené meroblastické rýhování (Collazo *et al.*, 1993) a dutina trávicí trubice u nich vzniká až sekundárně. To má zřejmě zásadní význam také pro odlišný způsob otevírání úst (Soukup *et al.*, 2013) a dá se předpokládat, že odklon od epiteliálního k mezenchymatickému typu morfogeneze předústního střeva je důsledkem těchto přestaveb raného embryonálního vývoje. Nápadná je také skutečnost, že sliznatky, žraloci, amniota, a do jisté míry i kostnatí, postrádají typické larvální stádium. Předústní

střevo se u těchto linií v poměrně raném vývoji redukuje, u bazálních paprskoploutvých naproti tomu právě během rané embryogeneze zastává zásadní roli ve formování hlavy a přispívá do struktur klíčových pro přežití čerstvě vylíhlých jedinců.

Zatímco meroblastické rýhování představuje odvozený stav, jenž se objevil několikrát nezávisle u různých linií obratlovců, holoblastické rýhování s výraznou dutinou archentera vznikající již během gastrulace může být považováno za znak společný všem druhoústým (Collazo *et al.*, 1993; obr. 27). Ancestrální morfogeneze předústního střeva se v takovém případě velmi pravděpodobně odehrávala způsobem podobným spíše situaci u bazálních paprskoploutvých, než mezenchymatickou expanzí prechordální destičky, jak byla popsána u amniot či žraloků.

5.2.4 Morfogeneze cementových žláz bazálních paprskoploutvých odkazuje na vývojové procesy známé u bezobratlých druhoústých

Podíváme-li se na vývojovou dynamiku nejanteriornějšího entodermu kopinatce, narazíme na řadu podobností s předústním střevem bazálních paprskoploutvých. V přední části těla, před prvním párem somitů, se vytváří pár entodermálních výchlípek velmi podobným způsobem, jaký byl popsán u bichira. Jedná se o levé a pravé Hatschekovo divertikulum, jež následně sledují odlišný vývojový osud (obě výchlípky bývají nicméně alternativně uváděny také jako deriváty mezodermu, homologické s protocoelem planktonních larev deuterostomát, viz Stach, 2002). Zatímco pravé divertikulum vytváří slepou tenkostěnnou hlavovou kavitu, levé divertikulum migruje k povrchu, kde se fúzí s ektodermálním epitelem otevírá do vnějšího prostředí obdobně, jako je tomu u cementových orgánů bichira a kostlína (Conklin, 1932). Namísto produkce adhezivního sekretu má však takto vzniklá preorální jamka funkci smyslovou a endokrinní. V sousedícím ektodermu rostrálně k jamce vzniká shluk obrvených buněk, který spolu s jamkou tvoří takzvaný preorální orgán, který je považován za homolog obratlovčí hypofýzy (Candiani *et al.*, 2008). Celkový topografický kontext tak připomíná stav u amniot, kde se entodermální Seesselova výchlípka během svého vývoje taktéž dostává do těsného kontaktu s hypofýzou (Jacobson *et al.*, 1979). Nutno nicméně dodat, že geny asociované se vznikem hypofýzy (jako například *pit-1* či *lhx3*) jsou exprimovány v entodermální části orgánu kopinatce (Butts *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2002), zatímco hypofýza obratlovců je původu striktně ektodermálního (Oisi *et al.*, 2012) (u hypofýzy tak v zásadě nastává podobná situace jako u *hatching gland* či cementových orgánů

obratlovců – zřejmě homologické orgány se v rámci ekto-entodermálního rozhraní u jedné linie zakládají v entodermu, zatímco u jiné v těsně sousedícím ektodermu).

Kaudálně od Hatschekových divertikul vzniká další derivát nejpřednějšího entodermu, takzvaná kyjovitá žláza (*club-shaped gland*). Zakládá se jako výchlípka na pravé straně faryngu, jež postupně vytvoří trubici vyúsťující na povrch těla otvorem v preorální oblasti ektodermu. V tomto případě je kromě nápadně podobné morfogeneze s cementovými orgány bichira či kostlína sdílena taktéž produkce mukózního sekretu a zejména exprese genu *foxe4* (Yu *et al.*, 2002), který je exprimován v předústním střevě bazálních paprskoploutvých (obr. 23). Doposud se zdálo, že kyjovitá žláza u obratlovců postrádá homolog (*foxe4* pozitivní štítná žláza obratlovců je homologem jiné struktury u kopinatce, endostylu; Candiani *et al.*, 2008), nicméně výsledky předložené v této práci naznačují, že mezi strukturami přední části faryngu kopinatce a bazálních paprskoploutvých existují jak morfologické, tak i funkční a genetické souvislosti.

Hluboko ve fylogenezi druhoústých příbuzných obratlovců nedávno vyvstala další, dříve přehlížená podobnost se zde pojednávaným předústním střevem ryb. Jedná se o stomochord polostrunatců. Orgán, dlouhá desetiletí považovaný za homolog notochordu strunatců (polostrunatci, Hemichordata, mu nakonec vděčí i za své jméno), postrádá expresi nejdůležitějších genů asociovaných se vznikem a signalizační funkcí notochordu. Naproti tomu exprimuje celou řadu typicky entodermálních genů, včetně *foxe* známého z předústního střeva či kyjovité žlázy kopinatce. Navíc vzniká jakožto epiteliální výchlípka anterodorzální stěny faryngu, tedy ve stejné pozici jako výše zmiňované struktury. Na základě těchto skutečností je v současnosti považován za derivát přední části střeva (Satoh *et al.*, 2014).

Přestože bez dalšího podrobného studia nelze bezrozporně prokázat homologii stomochordu a předústního střeva, nastíněný přehled dynamiky nejanteriornějšího entodermu ve fylogenezi obratlovců jasně naznačuje kontinuální přítomnost některé z výše popsaných forem anteriorní expanze entodermálního epitelu u většiny skupin (obr. 28). Komplexní interakce s ektodermem, respektive vznik ekto-entodermálního rozhraní a následná integrace předústního střeva bazálních paprskoploutvých do povrchového ektodermálního epitelu (tedy i přímá interakce střevního epitelu s vnějším prostředím dlouho před otevřením úst) se sice zdá v rámci obratlovců unikátní, nicméně mimo obratlovce nachází jasnou paralelu u kopinatce, kde deriváty nejpřednějšího entodermu sdílí hned tři základní charakteristiky: zakládají se v preorální pozici, splývají s

ektodermem za vzniku otvoru mimo bezprostřední kontext úst a mají sekretorickou funkci.

5.3 Význam studia cementových orgánů bazálních paprskoploutvých

Bichiři, jeseteři a kostlíni zastupují prastaré linie ryb, jež se oddělily dlouho před vznikem kostnatých. Přestože tvoří pouze nepatrnou část diverzity paprskoploutvých (přibližně 50 druhů proti 32 000; Froese & Pauly, 2017), představují jediné přeživší linie, které neprodělaly pro kostnaté typickou genomovou duplikaci (Qu *et al.*, 2015; Braasch *et al.*, 2016). Poskytují také nepostradatelný náhled do diverzity ontogenezí, jež existovaly před vznikem kostnatých, u nichž je v důsledku přechodu k meroblastickému rýhování telolecitálního vajíčka raný embryonální vývoj značně odvozený a překvapivě homogenní. Svou ranou ontogenezí tak v leccem připomínají některé zástupce čtvernožců a umožňují tak snazší pochopení evoluce některých klíčových znaků suchozemských obratlovců. Zároveň s jejich rostoucí popularitou stále častěji slouží jako *outgroup* právě pro evolučně morfologické či genomické studie kostnatých, již mohli být donedávna srovnáváni pouze s dobře zavedenými modely z řad čtvernožců (Braasch *et al.*, 2015).

Předkládaná práce představuje zatím nejkompletnější srovnávací a experimentální analýzu raného vývoje hlavového entodermu zástupců všech tří skupin bazálních paprskoploutvých. Na jejím základě se podařilo potvrdit předpoklad entodermálního původu cementových orgánů bichira, a zároveň prokázat, že tento typ morfogeneze je ancestrální pro všechny paprskoploutvé ryby. Entodermální cementové orgány, jež se na začátku studia jevily jako apomorfie mnohoploutvých (Polypteriformes) a vymykaly se dosavadnímu chápání homologie tohoto typu orgánů, zjevně představují dědictví po společném předku paprskoploutvých.

Jak již bylo výše zmíněno, v evoluci kostnatých došlo k zásadním přestavbám rané embryogeneze (Collazo *et al.*, 1993). Ukazuje se, že řada klíčových larválních adaptací bazálních linií (například vnější žábry a cementové orgány) se zakládá již v průběhu rané embryogeneze a ovlivňuje tak zásadním způsobem vývoj dalších embryonálních struktur, zatímco jak přídatné dýchací, tak adhezivní orgány kostnatých obvykle vznikají jako jednoduché epiteliální deriváty jiných larválních struktur (v uvedených případech zejména vnitřních žaber, respektive pokožky; Minařík, 2011; Crkvová, 2012), nikoli jako zcela svébytné morfogenetické celky zahrnující interakci

několika zárodečných vrstev. Zatímco bazální skupiny tak vykazují zásadní vzájemné odlišnosti již v nejranější embryogenezi, nezměrná diverzita larev kostnatých je generována až morfologickými změnami u vylíhlých jedinců, a embrya a nejranější larvy jsou překvapivě uniformní.

Kromě přínosu pro pochopení evoluce cementových orgánů ryb je práce zásadní taktéž z hlediska studia rané morfogeneze hlavy obratlovců. Presentované výsledky jasně definují předústní střevo jako svébytnou entodermální doménu v ontogenezi paprskoploutvých, jež nachází zřejmé obdoby i u dalších linií obratlovců. Přestože se tedy v průběhu evoluce cementových orgánů měnil embryonální kontext, v němž se tyto struktury u různých linií zakládají, doména, z níž vznikají u bichira a kostlína, je zřejmě společná všem obratlovcům. Předchozí pokusy o přijetí či odmítnutí homologie cementových orgánů napříč obratlovci tak byly vyslovovány navzdory zásadní neznalosti jejich morfogeneze u skupin, které jsou pro pochopení jejich evoluce zcela klíčové. Teprve zde prezentovaná zjištění o vývojovém kontextu vznikajících cementových orgánů bichira a kostlína tak v důsledku umožní srovnání s cementovou žlázou drápatky na jedné straně a žlázami kostnatých na straně druhé – tedy strukturami, jež byly doposud navzájem srovnávány jen s obtížemi.

Dosavadní hypotézy o homologii cementových orgánů byly zjevně pojmány příliš široce a budoucí analýzy budou vyžadovat její posouzení na jednotlivých, předem definovaných úrovních, v rámci nichž bude možno testovat dílčí hypotézy jednu po druhé ve světle zde prezentovaných poznatků. Závěrem je tedy nutné alespoň nastínit některé z nich: 1.) Cementové žlázy bazálních paprskoploutvých jsou iniciovány v entodermu extrémně anteriorní domény (*sensu* Dickinson & Sive, 2007) 2.) Za vývoj entodermálních cementových orgánů je zodpovědná genová regulační síť zahrnující transkripční faktory exprimované v cementové žláze drápatky; 3.) Cementová žláza bazálních paprskoploutvých a drápatky produkuje stejný typ sekretu a sdílí schopnost atrahovat senzorické neurony; 4.) Stejný vývojový modul je zodpovědný za vznik dorzálních ektodermálních žláz kostnatých; 5.) Entodermální cementové žlázy jsou homologické preorálními sekretorickými orgány kopinatce; 6.) Rozdílný zárodečný původ cementových orgánů uvnitř obratlovců je důsledkem vývojových posunů označovaných jako *developmental system drift* (True & Haag, 2001).

Uzavřít podobnou práci konstatováním, že s novými poznatky vyvstalo mnohem více otázek, než jich bylo zodpovězeno, by zajisté působilo jako zbytečné klišé. Nemluví o případném dovětku, že v tomto případě tomu tak skutečně je. Pokračující grantový

projekt GAČR 16-23836S vedený mým školitelem Robertem Černým, případně obhájená bakalářská a probíhající diplomová práce kolegyně Kristýny Markové či Viktorie Psutkové tak budiž důkazem, že je takové vyjádření opravdu na místě a předkládaná disertační práce se tak snad brzy dočká pokračování z rukou jiných.

6. Závěr

Do předložené práce byly zahrnuty výsledky ze tří rozmnožovacích sezón bichira, pěti sezón jesetera a tří sezón kostlína. U všech druhů byla úspěšně optimalizována pro účely práce speciálně vyvinutá technika injekce fluorescenční značky CM-DiI pro mapování příspěvku entodermu do povrchových struktur hlavy. Zahrnutí kostlína si vyžádalo celkem tři měsíce práce přímo v tropické líně v mexické Villahermose a adaptaci veškeré metodiky improvizovaným podmínkám v primárně akvakulturním zařízení. Přesto se podařilo detailně prostudovat ranou embryogenezi kostlína, zaznamenat detailně průběh vývoje a zavést tak tento druh jako rovnocenný modelový organismus, který je díky pokračující spolupráci s laboratoří Lenina Ariase Rodrigueze nadále k dispozici pro pokračující projekty. Podobná spolupráce se podařila uskutečnit s laboratoří Martina Pšeničky ve VÚRH ve Vodňanech, v tomto případě primární zásluhou Jana Štundla, jenž se také významně podílel na optimalizaci inkubace a dalšího zacházení s dodávanými jikrami jesetera na půdě katedry zoologie PřF UK. Získání živých embryí všech tří druhů pro účely této práce přineslo výjimečnou možnost komparativního studia druhů, které se v současnosti těší obrovskému zájmu evolučně-vývojových biologů (Braasch *et al.*, 2015), avšak jen velmi malý počet laboratoří má spolehlivý přístup buď jen ke dvěma z těchto druhů současně.

V průběhu disertačního projektu byl s využitím nashromážděného materiálu experimentálně prokázán entodermální zárodečný původ cementových orgánů bichira a kostlína, stejně jako *hatching gland*, hmatových vousů a báze rostra jesetera (obr. 7-11). Entodermální cementové orgány dle provedených mikrotomografických analýz vznikají z párové výchlípký nejpřednějšího entodermu prvostřeva (obr. 15), jež je v práci označována jako předústní střevo. Stejná, avšak mediálně uložená nepárová výchlíпка dává vzniknout strukturám na bázi rostra jesetera. Histologický kontext a exprese transkripčních faktorů *pitx2*, *otx2/5* a *bmp4* (obr. 21,23) ukazují, že předústní střevo v raných stádiích vzniku odpovídá entodermu extrémně anteriorní embryonální domény tak, jak byla popsána u drápatky (Dickinson & Sive, 2007) – jde tedy o nejpřednější entoderm přímo sousedící s anteriorním ektodermem, v rámci něhož vzniká primordium adenohipofýzy a primární ústa.

Získaná data naznačují, že v evoluci cementových orgánů došlo k posunu související genové regulační sítě z anteriorního ektodermu do sousedícího entodermu či

naopak, obdobně, jako bylo popsáno u *hatching gland* (Nagasawa *et al.*, 2016). Jelikož bezčelistným (Cyclostomata) i parybám (Chondrichthyes) cementové žlázy chybí, není zatím možno definitivně určit, který z typů cementových orgánů je původní. V budoucnu tak bude vhodné zaměřit se na detailní srovnání se sekretorickými žlázami kopinatce a stomochordem polostrunatců. Předchozí práce uvažovaly homologii cementových žláz drápatky a kostnatých na základě sdíleného ektodermálního původu a koexprese *pitx2* a *bmp4* v primordiu žlázy (Pennati *et al.*, 2000; Gropelli *et al.*, 2003; Pottin *et al.*, 2010; Rétaux & Pottin, 2011). Předkládaná práce nicméně bezrozporně ukazuje na původně entodermální původ cementových žláz všech paprskoploutvých. Pro homologizaci cementových orgánů kostnatých a žab tak bude nutné nejprve detailnější srovnání právě s entodermálními žlázami bichira a kostlína. Právě detailní popis jejich vývoje předložený v této práci je pro další analýzy klíčovým výchozím bodem.

Entodermální původ cementových žláz bazálních paprskoploutvých se ukázal zásadním pro pochopení ontogeneze některých problematických struktur obratlovčí hlavy, jakými je prechordální destička a s ní související hlavové kavity. Mimo jiné se ale jedná také o projev faryngeálního typu morfogeneze (tvorby epiteliálních výchlípek) v premandibulární oblasti, a v neposlední řadě první detailně doložený příklad entodermálního původu povrchových struktur hlavy. Výchlípky předústního střeva tak představují novou, doposud pouze teoreticky předpokládanou morfogenetickou doménu (Allis, 1938), která zatím nebyla v plně rozvinuté formě pozorována u žádného žijícího obratlovce. Zatímco doposud bez výjimky platilo, že k fúzi ektodermálního epitelu s entodermem a následné tvorbě otvoru dochází v ontogenezi druhoústých pouze v kontextu úst, faryngu a análního otvoru, předkládaná práce přidává právě předústní střevo jako další a navíc nejranější ekto-entodermální rozhraní v rámci vyvíjející se hlavy, v němž ke splynutí epitelů dochází ještě před otevřením úst či žaberních štěrbin.

Předústní střevo jasně demonstruje způsob, jakým se odehrávala morfogeneze hlavy u předka všech paprskoploutvých ryb. Přestože kostnatí tvoří cementové žlázy v ektodermu (Minařík, 2011), v jejich rané embryogenezi se objevuje rudimentární struktura zjevně homologická s předústním střevem, mající jako u jesetera funkci takzvané *hatching gland* a u dánia či medaky tradičně považovaná za derivát prechordální destičky (Swindell *et al.*, 2008). Z detailního srovnání hlavových struktur napříč obratlovcí vyplývá, že také prechordální destička sliznatek, žraloků či amniot, často považovaná za strukturu mezodermálního původu (Parker, 1917; Aasar, 1931; Aoto, 2009), odpovídá svým vznikem a expresí některých klíčových genů rudimentárnímu

předústnímu střevu. Spíše mezenchymatický charakter morfogeneze prechordální destičky, nápadně odlišný od epiteliálních výchlípek předústního střeva bazálních paprskoploutvých, může být způsoben odvozeným vývojem embryí zmiňovaných skupin z telolecitálního vajíčka (Collazo *et al.*, 1993). Mesolecitální vajíčko bazálních paprskoploutvých a následná gastrulace zahrnující vznik prostorné dutiny prvostřeva představuje ancestrální typ embryogeneze obratlovců (Collazo *et al.*, 1993; Takeuchi *et al.*, 2009) a dá se tedy předpokládat, že podobně je tomu u epiteliálního charakteru morfogeneze předústního střeva.

Přestože tedy cementové žlázy u řady linií obratlovců chybí a u těch, u nichž jsou přítomny, vznikají z různých zárodečných vrstev, předústní střevo, ať už v podobě výchlípky či prechordální destičky, je znakem společným všem obratlovcům (obr. 27). Rozřešení evolučního původu prechordální destičky sahá daleko nad rámec jediného doktorského projektu. Stejně tak definitivní zhodnocení homologie cementových orgánů, jež se ukázaly evolučně mnohem komplexnějšími, než se doposud zdálo. Nezbývá tak než doufat, že publikace dosažených výsledků v červencovém čísle časopisu *Nature* přitáhne k těmto doposud nedoceneným strukturám adekvátní pozornost.

7. Materiál a metody

7.1 Embrya a larvy studovaných druhů

V rámci doktorského projektu byla využívána embrya a larvy několika druhů obratlovců, které se vyznačují přítomností larválních cementových orgánů. Konkrétně šlo o drápatku vodní (*Xenopus laevis*) získanou z chovů katedry buněčné biologie PřF UK, skaláru amazonskou (*Pterophyllum scalare*), jejíž embrya a larvy jsou dostupné mezi chovateli akvariálních ryb, bichira senegalského (*Polypterus senegalus*) z vlastních chovů na katedře zoologie PřF UK, jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) dodávaného Výzkumným ústavem rybářským a hydrobiologickým ve Vodňanech, a konečně kostlína mexického (*Atractosteus tropicus*), odebíraného z líhni Universidad Juárez Autónoma de Tabasco v mexické Villahermose.

Vajíčka, embrya a larvy drápatky, bichira a kostlína byly po dobu vývoje drženy v petriho miskách s čistou vodou, případně s médiem E2 Pen/Strep (Brand *et al.*, 2002), pokud již byla dekapulována. Skaláry byly do vylíhnutí ponechány v plastovém akváriu s keramickým vytíracím kuželem, na němž byla vajíčka nakladena. Po vylíhnutí byly přemístěny do čistého akvária se vzduchováním. Pro jesetery byla sestavena vzduchovací aparatura sestávající s převrácených PET lahví a vzduchováním zabudovaným v utěsněném ústí, aby byla zajištěna neustálá cirkulace jiker a zabránilo se tak jejich shlukování, jež u těchto náročných ryb vede k rychlému úhynu. Celá aparatura byla držena při 16–19 °C a voda byla pravidelně měněna za čerstvou. Po vylíhnutí byly larvy přemístěny do petriho misek s médiem E2 Pen/Strep. Odebraná embrya byla v požadovaných stádiích anestetizována v roztoku MS-222 (Serva) a fixována s přihlédnutím k dalšímu použití. Vzorky pro běžné histologické a imunohistochemické značení byly fixovány v 4% PFA a uchovávány při 4 °C. Před použitím byly několikrát promyty 0,1M roztokem PBS (Sigma-Aldrich). Vzorky pro RNA *in situ* hybridizace byly v PFA fixovány pouze přes noc a poté byly postupně převedeny do 100% methanolu a skladovány při –20 °C.

Vývojová stádia drápatky vodní byla určena podle publikované tabulky normálního vývoje (Nieuwkoop & Faber, 1956). U skaláry amazonské, kde podobná tabulka zatím není k dispozici, bylo stáří embryí zaznamenáno jako počet dnů od oplození (DPF – *days post-fertilization*), stáří larev pak jako počet dnů od vylíhnutí (DPH – *days*

post-hatching). U bichira senegalského bylo použito stádiování z publikace *Development of non-teleost fishes* (Diedhiou & Bartsch, 2009), u jesetera malého vývojové tabulky pro jesetera ruského (Dettlaff *et al.*, 1993) a u kostlína mexického tabulka vývoje kostlína skvrnitého (Long & Ballard, 2001). V případech, kdy dostačovalo pouze přibližné určení stáří jedince, byla používána obecná označení vývojových stádií obratlovců (neurula, stádium ocasního pupene – “tailbud”, faryngula, stádium líhnutí, stádium otevření úst), zpravidla dohledatelná ve výše citovaných vývojových tabulkách.

7.2 Skenovací elektronová mikroskopie

Vzorky určené pro elektronmikroskopické analýzy byly postfixovány přes noc v modifikovaném Karnovského fixativu (2,5% roztok glutaraldehydu v 4% roztoku PFA) a po následném několikanásobném promytí v 0,1M roztoku PBS dehydratovány vzestupnou ethanolovou řadou (25–50–70–80–90–95–100–100%, 10–15 minut na každý krok). Dehydratované vzorky byly umístěny jednotlivě do porézních kapslí s 30 μ m póry (SPI Supplies) vyplněných vatou bránící poškození vzorku o stěny kapsle během vysoušení. Vysoušení bylo provedeno metodou Critical Point Drying v aparatuře Bal-Tec CPD 030. Hotové vzorky byly připevněny pomocí pryskyřice TempFix (SPI Supplies). 1mm plátek pryskyřice byl umístěn na kovový terčik rozeřtý na 120 °C, a po roztátí rozetřen podložním sklem na homogenní vrstvu. Po zatuhnutí vrstvy pryskyřice bylo každé embryo napolohováno do důlku vytvořeného preparační jehlou. Terčik byl poté umístěn zpět na horkou plotýnku rozeřtávanou na 100 °C. Po ukotvení vzorků do finální polohy roztavenou pryskyřicí byl terčik přesunut zpět na chladný povrch. Po zatuhnutí pryskyřice byly terčíky se vzorky pozlaceny v aparatuře Bal-Tek SCD 050 a následně snímány pod skenovacím elektronovým mikroskopem JEOL 6380 LV.

7.3 PAS barvení

Pro prvotní identifikaci cementových orgánů bylo použito histologické barvení kyselinou jodistou a Schiffovým činidlem (PAS), běžně používaným pro detekci mukopolysacharidů. Aplikace kyseliny jodisté vytváří volné aldehydové skupiny specificky v polysacharidových řetězcích, s nimiž posléze reaguje Schiffovo činidlo za vzniku červenofialového zbarvení. K barvení byl použit komerčně dostupný kit (Sigma-Aldrich) určený k aplikaci na histologické řezy. Protokol od výrobce byl modifikován k použití na celých larvách. Před samotným barvením byl aplikován roztok Lillie Aldehyde

Block (1,041 g hydrogensířičitanu sodného ve 100 ml destilované vody; Lillie, 1965) po dobu 2–4 hodin. Tím byly neutralizovány endogenní aldehydové skupiny před inkubací v kyselině jodisté. Po důkladném promytí destilovanou vodou byly larvy přeneseny do roztoku kyseliny jodisté a inkubovány po dobu 5 minut. Poté byly třikrát promyty destilovanou vodou a přeneseny na mikroskopické sklíčko, kde byly inkubovány v kapce Schiffova činidla po dobu 2–10 minut. Jelikož se výsledné barvivo vyvíjí i během následného promývání, bylo nutné barevnou reakci ukončit při prvním náznaku vznikajícího specifického zabarvení. Larvy byly poté třikrát promyty destilovanou vodou a přeneseny do kádinky s proudící kohoutkovou vodou, kde byly ponechány po dalších 10 minut. Po promytí byly převedeny do 100% methanolu a skladovány při 4 °C.

7.4 Histologie

Embrya a larvy určené pro poloténkové řezy byly převedeny do 100% ethanolu. Složky A a C komerčně dostupné pryskyřice JB-4 (Polysciences) byly promíchány 20 minut při pokojové teplotě v množství 0,5 g C na 20 ml A. Embrya byla ve směsi A+C inkubována přes noc. Před zalitím do formy byla následující den na každý 1 ml zbylé směsi A+C přidána jedna kapka roztoku B a vzniklá směs byla promíchávána po dobu 5 minut. Embrya byla následně promyta a zalita v roztoku A+B+C. Destička se vzorky byla přenesena do dusíkového exsikátoru a po napolohování embryí do správné pozice inkubována po 2–3 hodiny bez přístupu vzduchu. Vytvrzené bločky byly nařezány nejdříve následující den na mikrotomu Leica RM 2155 na tloušťku 2–5 µm. Jednotlivé řezy byly vyrovnány na vodní hladině a přeneseny na mikroskopické sklíčko. K barvení byl použit roztok Azure B/Eosin (3,2 ml Azure B a 0,8 ml Eosinu na 100 ml destilované vody), v němž byla sklíčka ponechána po dobu 2–4 minut. Obarvená sklíčka byla důkladně promyta destilovanou vodou a po usušení převedena na trvalé preparáty s použitím DPX Mountant média (Sigma).

7.5 Imunohistochemie

Vzorky pro imunohistochemické analýzy byly fixovány v PFA a před použitím převedeny do PBS. Pro krájení s pomocí vibratomu Leica VT1200 S byla embrya zalita do 1% roztoku agaru a po zatvrdnutí oříznuta do podoby vhodně orientovaného bločku. Ten byl pomocí sekundového lepidla připevněn na držák. Vzorky byly krájeny pod PBS na tloušťku 40 µm a odebírány do připravené petriho misky. V té také proběhlo

imunohistochemické značení. Protilátka byla aplikována po 10 minutách inkubace v BSA (bovine serum albumin), a to ředěná v PBS na níže specifikovanou koncentraci. Používány byly protilátky proti fibronektinu (Dako A0245, 1:500), aktinu (Sigma-Aldrich A1978, 1:1000) a acetylovanému tubulinu (Sigma-Aldrich T6793, 1:2000). Po nejméně hodině a půl inkubace za pokojové teploty, respektive inkubaci přes noc v lednici, následovalo 3x promytí v PBS po nejméně 10 minut. V případě použití fluorescenční sekundární protilátky byla tato použita v koncentraci 1:500. Alternativně bylo použito také značení pomocí DAB s užitím Vectastain kitu (Vector) podle návodu poskytnutého výrobcem.

Pro pořízení detailnějších fotografií byli někteří jedinci řezáni v parafínu pomocí mikrotomu. Vzorky byly nejprve dehydratovány v ethanolu, poté inkubovány 3x20 minut v Histosolu (National Diagnostics) a následně 2x20 minut ve směsi Histosolu s parafínem při 60 °C. V čistém parafínu byly následně inkubovány při 60 °C přes noc a poté 7x promyty vždy po 60 minutách. Po zalití do bločku byl vzorek vytvrzen přes noc a pomocí parafínu připevněn na dřevěný bloček. Na mikrotomu byly krájeny řezy o tloušťce cca 8 µm. Řetízky řezů byly přeneseny na vodní hladinu v kádince a z ní na podložní sklíčko. Po zaschnutí byly odparafínovány promytím 2x10 minut v Histosolu, 5 minut v ethanolu a na závěr 5 minut v destilované vodě.

Na podložní sklíčka s hotovými řezy bylo aplikováno médium Fluoroshield (Sigma-Aldrich) obsahující DAPI. Poté byla přikryta krycím sklíčkem. Na některé řezy imunohistochemicky značené pomocí DAB bylo aplikováno barvení PAS (viz výše) podle instrukcí dodávaných výrobcem.

7.6 Transplantace cementových orgánů

Embrya drápatky ve stádiu 20-21 byla umístěna do petriho misky na vrstvu plastelíny. Hostitelská embrya byla upevněna do důlku levou stranou vzhůru a v laterálním ektodermu těsně za okem byl vyříznut otvor o velikosti odpovídající cementové žláze. Dárcovská embrya byla v téže misce upevněna kraniálním koncem vzhůru a jakmile byl otvor v hostitelském embryu připraven, byla jim opatrně odebrána cementová žláza. Žláza byla na preparační jehle přemístěna do otvoru v pokožce hostitelského embrya a zajištěna na místě tenkým proužkem plastelíny ukotveným do substrátu v misce. Jakmile bylo patrné zhojení operační rány, byla embrya přemístěna do čistého média a inkubována až do dosažení stádia 36. Poté byla imunohistochemicky detekována nervová

vlákna a embrya byla analyzována pomocí fluorescenčního stereomikroskopu. Experimenty na drápatkách probíhaly v Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA v rámci kurzu Embryology: Concepts & Techniques in Modern Developmental Biology v létě 2015.

7.7 Fate-mapping

Pro *fate-mapping* experimenty byla využívána embrya bichira, jesetera a kostlína. Díky minimálnímu překryvu reprodukčních sezón u těchto druhů (únor až červen pro jesetera, červen až říjen pro kostlína, říjen až duben pro bichira) bylo možné experimenty provádět v zásadě celoročně. Technika *in vivo* fluorescenčního značení entodermálních buněk a sledování jejich příspěvku do formující se hlavy (*fate-mapping*) byla vyvinuta speciálně pro účely této práce (obr. 7). Použitá fluorescenční značka CM-DiI (Thermo Fisher Scientific) je běžně používána k přímému injikování embryonálních tkání. Aplikované množství značky proniká přes cytoplazmatickou membránu buněk v bezprostředním okolí vpichu. V cytoplazmě se následně štěpí a výsledný produkt dále nedifunduje, čímž umožňuje spolehlivé fokální značení relativně malého množství buněk. Toho bylo minulosti úspěšně využíváno například při přesném mapování příspěvku jednotlivých proudů neurální lišty do hlavových struktur (Selleck & Bronner-Fraser, 1995) či studiu migrace a diferenciací smyslových plakod (Modrell *et al.*, 2011). Za účelem zmapování příspěvku entodermu do cementových orgánů bylo však třeba plošně označit co největší část epitelu prvostřeva, a zároveň předejít nechtěnému označení ektodermu orální oblasti. Embrya bichira, jesetera a kostlína byla tedy injikována skrze anteriorní část neurální ploténky ve stádiu neuruly, kdy je dutina prvostřeva nejrozměrnější (obr. 3). Roztokem CM-DiI byla vyplněna celá dutina, čímž bylo dosaženo plošného označení entodermálního epitelu a zároveň pouze minimální kontaminace ostatních tkání v místě vpichu (konkrétně pouze neuroektoderm, jenž do výsledných struktur v orální oblasti nikterak nepřispívá). U embryí kostlína bylo vzhledem k snadné lokalizaci dutiny prvostřeva pod vyvíjejícím se embryem možné injikovat také ze strany, skrze laterální postkranální ektoderm těsně před vyvíjejícími se základy pronephros. Tento způsob se vzhledem k nedostatku prostoru mezi vznikajícími neurálními valy u kostlína ukázal jako vhodnější.

Embrya byla nejprve manuálně dekapsulována (z výjimkou jesetera, u kterého byl ponechán těsně přiléhající chorion) a umístěna do komůrek odpovídající velikosti v

přibližně 2 mm silné vrstvě 2,5% agaru na Petriho misce naplněné médiem E2 pen/strep. Série stejně velkých komůrek byla vytvořena pomocí vhodně zastřižené plastové Pasteurovy pipety. 50 μ l kapiláry (Drummond Microcaps) byly vytaženy na pulleru Narishige pc-10 a před použitím zlomeny na vhodný průměr hrotu. Zásobní roztok CM-DiI (10 μ g v 50 μ l 100% ethanolu) byl zředěn 1:5 s 10% roztokem sacharózy a během experimentu uchovávan v ultrazvukové lázni aby se předešlo vysrážení barviva na stěnách mikrozkuřavky. Kapiláry byly plněny z 5 μ l kapky nanesené na parafilmu. K injikaci byl použit manuální mikroinjektor Eppendorf CellTram vario, případně vlastnoručně zhotovený mikroinjektor sestávající z 50ml injekční stříkačky, silikonové hadičky a adaptéru na mikrokapiláru. Vzhledem k velikosti embryí nebylo nutno použít mikromanipulátor.

Během injikace CM-DiI do dutiny prvostřeva směřoval hrot šikmo dopředu aby se maximální množství značky koncentrovalo ve vznikajícím faryngu (obr. 7A). Pokud po vytažení kapiláry ze vzniklého otvoru v neurální ploténce unikalo větší množství barviva, bylo toto odstraněno jemným proudem média z plastové Pasteurovy pipety aby se předešlo značení okolního ektodermu. Část embryí byla po injikaci zafixována ve 4% PFA během hodiny po injikaci pro ověření úspěšného pronikání CM-DiI do epitelu. Zbylá embrya byla kultivována v Petriho miskách naplněných médiem E2 pen/strep do dosažení vhodného stádia. Médium bylo měněno nejméně jednou denně a mrtvá embrya byla pravidelně odstraňována. Embrya byla posléze anestetizována, fixována v 4% PFA přes noc a následně pozorována a fotografována pod stereomikroskopem. Úspěšně značení jedinci byli poté nařezáni na vibratomu a označeni protilátkami proti fibronektinu (viz kapitola 3.4). Obarvené řezy byly analyzovány na fluorescenčním mikroskopu. Z analýz byli vyřazeni jedinci, u nichž byly neúmyslně označeny migrující proudy neurální lišty (například vlivem neopatrné injikace příliš blízko neurálního valu), jež by vzhledem k významnému příspěvku do mnoha hlavových struktur v pozdějších stádiích komplikovaly lokalizaci označeného entodermu.

Souběžně s injikací CM-DiI bylo testováno taktéž využití zelené fluorescenční značky CFDA-SE (Life Technologies) s obdobným principem značení cytoplasmy. 2 mg CFDA-SE byly rozpuštěny v 60 μ l DMSO. 25 μ l zásobního roztoku v 5 ml E2 Pen/Strep média bylo posléze použito buď pro injikaci entodermu stejným způsobem jako v případě CM-DiI, nebo pro značení ektodermu vykoupáním embryí v roztoku CFDA-SE po dobu 45 minut. Značená embrya byla přenesena do čerstvého E2 Pen/Strep média a kultivována do dosažení vhodného stádia. Přestože značení entodermu dosahovalo výsledků

srovnatelných s CM-DiI a experimenty se značením ektodermu byly taktéž slibné, CM-DiI se ukázalo jako stabilnější při následných analýzách pod fluorescenčním mikroskopem, a bylo tedy používáno prioritně.

7.8 Micro CT

Mikrotomografické (Micro CT) snímkování probíhalo v rámci čtyřměsíční stáže v laboratoři Briana D. Metschera na katedře teoretické biologie univerzity ve Vídni (Department of Theoretical Biology, University of Vienna). Pro Micro CT analýzy byla použita embrya fixovaná v 4% PFA, případně ve 100% ethanolu. Před zpracováním byla postfixována přes noc v modifikovaném Karnovského fixativu (2,5% roztok glutaraldehydu v 4% roztoku PFA), a následně převedena do 70% ethanolu. Vysokého diferenciálního kontrastu měkkých tkání embrya bylo dosaženo inkubací v 1% roztoku kyseliny fosfowolframové (PTA) v 70% ethanolu přes noc. Kontrastovaná embrya byla zalita do 2,5% agaru uvnitř na konci zatavené 200 μ l špičky a před zatuhnutím agaru vhodně napolohována. Špička byla následně zakryta parafilmem a upevněna na podstavec v komoře tomografu MicroXCT (Xradia) a skenována s použitím wolframového zdroje (Hamamatsu L9421-02) na výsledné rozlišení 2–4 μ m na voxel. Celkem bylo pořízeno přibližně 1000 projekčních snímků během postupného otáčení objektu. Z těchto snímků byla poté pomocí softwaru XMReconstructor (Xradia) vytvořena série tomografických řezů, jež byly posléze exportovány jako série 16bitových obrázků ve formátu TIFF.

Rekonstruovaná data byla načtena do softwaru FIJI, kde byla orientace řezů přizpůsobena pro zobrazení v horizontální rovině embrya. Takto orientované řezy byly poté analyzovány za použití softwaru Amira 5.3 (Visage Imaging). Entodermální epitely byly identifikovány na základě výrazně vyšší denzity, projevující se zbarvením ve světlejších odstínech šedi než ostatní měkké tkáně (obr. 15). Oblasti hlavového entodermu byly manuálně označeny a uloženy jako samostatný objekt, jehož 3D rekonstrukci bylo poté možno zobrazit v kontextu ostatních měkkých embryonálních tkání. Tam, kde bylo kontrastováním pomocí PTA dosaženo dostatečného diferenciálního kontrastu, byly obdobně segmentovány další struktury jako nervová soustava, notochord, smyslové plakody, či hlavové kavity. Pro obrazové tabule bylo použito zobrazení VRT (volume rendering technique) a MIP (maximum intensity projection). První jmenované zobrazení využívá mapování textur na 3D objekt a je tedy vhodné zejména k zobrazení povrchu embryí. Přidáním průhlednosti je pak možné v rámci embrya zobrazit

segmentované objekty. Druhé zmíněné zobrazení do každého pixelu výsledného 2D snímku promítá vždy pouze nejjasnější odpovídající voxel, díky čemuž je uvnitř objektu možné dobře pozorovat struktury o vyšší denzitě (obr. 12-16).

7.9 Enzymatická metalografie

Použité Micro CT vybavení poskytuje výsledná obrazová data výhradně ve stupních šedi. Na rozdíl od klasické histologie či imunohistochemie tak nedovoluje značení konkrétních zájmových struktur odlišnými barvami umožňujícími jejich více či méně jednoznačnou identifikaci. Za účelem specifické vizualizace embryonálních struktur je nicméně možné selektivně navýšit rentgenovou denzitu těchto struktur s využitím kombinace běžně dostupných imunohistochemických protilátek s jejich následnou detekcí pomocí metod enzymatické metalografie. V principu je tak dosaženo precipitace nerozpustných kovových částic, v našem případě stříbra, z roztoku právě v místě vazby komplexu sekundární protilátky a enzymu křenové peroxidázy (HRP). Vzniklé výrazně tmavé zbarvení cílové struktury, snadno detekovatelné pod stereomikroskopem, je možné následně vizualizovat s pomocí Micro CT.

Před započítím značení jsou embrya depigmentována v roztoku 37% peroxidu vodíku a 100% methanolu 1:1 po dobu asi 45 minut. Po postupné rehydrataci do MABT (Maleic Acid Buffer + Triton X-100) byla promyta MABT s 1% saponinem, ošetřena proteinázou K (5 µg/ml) po dobu 5–15 minut a postfixována ve formalínu po dobu 30 minut. Po dvou promytích v MABT s 1% saponinem byla embrya inkubována 1,5–3 hodiny v blokovacím roztoku (0,5% Roche blocking reagent, 10% Goat serum, 1% DMSO, 0,1% saponin v MABT). Primární protilátka (1:2000 v blokovacím roztoku) byla aplikována přes noc ve 4 °C. Po dvou promytích v MABT byla aplikována sekundární protilátka konjugovaná s HRP, a to po dobu nejméně 6 h v pokojové teplotě. Před vlastní metalografickou reakcí byla embrya promyta nejméně pětkrát roztokem MABT s 0,1% saponinem. Kit EnzMet (Nanoprobes) pro enzymatickou metalografii byl použit v souladu s návodem od výrobce. Chromogenní reakce byla zastavena přibližně po deseti minutách pomocí 1% thiosíranu sodného. Embrya byla převedena do methanolu a do Micro CT snímání skladována při –20 °C.

Vzhledem k mnohonásobně vyšší rentgenové denzitě stříbra proti měkkým tkáním kontrastovaným běžně používanými činidly (PTA, iodid draselný) se výsledný obraz omezuje pouze na označené struktury bez dalšího tkáňového kontextu. Tento problém lze

částečně eliminovat alternativním značením pomocí diaminobenzidinu (DAB), běžně používaného pro nefluorescenční imunohistochemické značení. Namísto použití metalografického kitu jsou takto zpracovávaná embrya inkubována v roztoku DAB (1,5 mg na 10 ml PBS) smíchaným s 0,2 μ l 30% peroxidu vodíku na 1,5 ml roztoku. Po 5–10 minutách je chromogenní reakce zastavena opakovaným promytím v destilované vodě. Vzorky jsou poté kontrastovány oxidem osmičelým. Ten se využívá k nespecifickému kontrastování měkkých tkání (Metscher, 2009), ale je také známa jeho preferenční vazba na DAB (Monga *et al.*, 1972), čímž je možno dosáhnout přednostního značení zájmových struktur při současném získání dostatečného diferenciálního kontrastu měkkých tkání. Vzhledem ke značné toxicitě oxidu osmičelého je nicméně při jeho použití nutno postupovat velmi obezřetně. Embrya jsou nejprve převedena do 0,1M roztoku fosfátového pufru (PB) a inkubována přes noc při 4 °C. Poté jsou inkubována v 0,1% roztoku oxidu osmičelého po dvě hodiny za pokojové teploty a následně opakovaně promyta PB (5x10 minut a poté přes noc při 4 °C) před následným snímáním pomocí Micro CT. Použité roztoky je před likvidací nutno vhodným způsobem neutralizovat.

7.10 RNA *in situ* hybridizace

Embrya pro *in situ* hybridizace (ISH) byla fixována v PFA přes noc a poté převedena do 100% methanolu a skladována při -20 °C. Před použitím byla embrya rehydratována, vybělena pod silným zdrojem světla v bělicím roztoku (formamid, 20x SSC, 30% peroxid vodíku, destilovaná voda) a natráven pomocí 2 μ g/ml roztoku proteinázy K (Sigma-Aldrich). Po postfixování 20 minut v PFA byla převedena do hybridizačního roztoku (50% formamid, 4x SSC, 0.1mg/ml heparin, 1 \times Denhardtův roztok, 0.1% CHAPS, 0.2mg/ml kvasinková RNA, 10mM EDTA, 0,1% Tween-20) a po několika promytích inkubována v hybridizačním roztoku s digoxigeninem značenou próbou v koncentraci 1:1000 přes noc při 60 °C. Po inkubaci byla embrya několikrát promyta posthybridizačním roztokem (50% formamid, 4x SSC, 0.1% Tween-20), převedena do MABT (100mM kyselina jablečná, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20) a poté inkubována v blokovacím roztoku (2% Roche blocking reagent, 20% sheep serum) nejméně dvě hodiny. Poté byla embrya inkubována přes noc při 4 °C v roztoku protilátky proti digoxigeninu, konjugované s alkalickou fosfatázou (Roche, 1:3,000). Následující den byla opakovaně promývána v MABT (minimálně 6x, 30 minut na promytí) a následně inkubována 10 minut v NTMT (0.1M Tris, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂) a poté při 4 °C

přes noc v BM Purple substrátu pro alkalickou fosfatázu (Roche). Reakce byla zastavena promytím v PBS a postfixací v PFA jakmile se vyvinul dostatečný barevný signál. Použité próby byly syntetizovány Davidem Jandzíkem a detailní informace o jejich sekvencích jsou k dispozici v příložené publikaci.

7.11 Mikroskopická technika a analýza dat

Celá embrya a larvy byly pozorovány pod stereomikroskopem Olympus SZX 12 s digitální kamerou Olympus v petriho miskách s vrstvou agaru, naplněných 0,1M roztokem PBS. Větší hloubky ostrosti bylo dosaženo metodou “focus stacking” – s využitím softwaru QuickPHOTO MICRO (Promicra) a motorizovaného ostřicího šroubu byla vždy nasnímána série několika fotografií, jež byly následně automaticky složeny v modulem Deep Focus. Fluorescenčně značené vzorky byly pozorovány pod fluorescenčním stereomikroskopem Zeiss SteREO Lumar.V12. S pomocí softwaru ZEN, dodávaného přímo výrobcem mikroskopu, byly nejprve automaticky pro každý barevný kanál zvlášť nasnímány série snímků zaostřené v různých rovinách ostrosti. Ty byly následně přímo v softwaru složeny do výsledného vícekanálového snímku s vysokou hloubkou ostrosti.

Histologické řezy byly pozorovány pod mikroskopem Olympus BX51 s UV lampou pro analýzy fluorescenčně značených vzorků. 30–40 mm široké vibratomové řezy byly fotografovány metodou “focus stacking” obdobně jako tomu bylo u celých embryí. Jelikož mikroskop není vybaven motorizovaným ostřením a odpovídajícím softwarem, bylo přeastřování prováděno ručně tak, aby byly postupně proostřeny ty roviny ostrosti, jež zahrnovaly většinu zájmových struktur. Postup byl opakován zvlášť pro každý barevný kanál. Výsledné fotografie s vysokou hloubkou ostrosti pro každý kanál byly vytvořeny v softwaru Helicon Focus (Helicon Soft). Vícekanálový snímek byl poté složen pomocí softwaru Fiji. Poloténké a parafínové řezy byly fotografovány standardně. Pro lepší rozlišení buněčných rozhraní v cementových orgánech byl v některých případech využíván mikroskop Olympus AX70, vybavený kamerou Olympus DP72 a umožňující použití Nomarského kontrastu.

Získaná obrazová data byla zpracována v programu Fiji a Corel PHOTO-PAINT. Výsledné obrazové tabule byly vyprodukovány v programu Corel PHOTO-PAINT X5. Veškerá vektorová grafika byla vytvořena v programu Corel DRAW X5. Pro analýzy mikrotomografických dat byl využíván software Avizo/Amira.

8. Seznam literatury

- Aasar, Y. H. (1931). The History of the Prochordal Plate in the Rabbit. *Journal of Anatomy*, 66(Pt 1), 14-i3.
- Adachi, N., & Kuratani, S. (2012). Development of head and trunk mesoderm in the dogfish, *Scyliorhinus torazame*: I. Embryology and morphology of the head cavities and related structures. *Evolution & Development*, 14(3), 234–256.
- Adachi, N., Takechi, M., Hirai, T., & Kuratani, S. (2012). Development of the head and trunk mesoderm in the dogfish, *Scyliorhinus torazame*: II. Comparison of gene expression between the head mesoderm and somites with reference to the origin of the vertebrate head. *Evolution & Development*, 14(3), 257–276.
- Alexander, J., & Stainier, D. Y. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Current Biology*, 9(20), 1147–1157.
- Allis, E. P. (1938). Concerning the Development of the Prechordal Portion of the Vertebrate Head. *Journal of Anatomy*, 72(Pt 4), 584–607.
- Aoto, K., Shikata, Y., Imai, H., Matsumaru, D., Tokunaga, T., Shioda, S., ... Motoyama, J. (2009). Mouse *Shh* is required for prechordal plate maintenance during brain and craniofacial morphogenesis. *Developmental Biology*, 327(1), 106–120.
- Baker, C. V. H., Modrell, M. S., & Gillis, J. A. (2013). The evolution and development of vertebrate lateral line electroreceptors. *Journal of Experimental Biology*, 216(13), 2515–2522.
- Bennemann, R., & Pietzsch-Rohrschneider, I. (1978). The morphology of the cement gland apparatus of Larval *Pterophyllum scalare* Cuv. & Val. (Cichlidae, Teleostei). *Cell and Tissue Research*, 193(3), 491–501.
- Blanco, M. J., Barrallo-Gimeno, A., Acloque, H., Reyes, A. E., Tada, M., Allende, M. L., ... Nieto, M. A. (2007). *Snail1a* and *Snail1b* cooperate in the anterior migration of the axial mesendoderm in the zebrafish embryo. *Development*, 134(22), 4073–4081.
- Bolker, J.A. (2004). Embryology. In: LeBreton, G. Sturgeons and paddlefish of North America. *Kluwer Academic Publishers: Dordrecht*; Boston, 2004.
- Braasch, I., Gehrke, A. R., Smith, J. J., Kawasaki, K., Manousaki, T., Pasquier, J., ... Postlethwait, J. H. (2016). The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nature Genetics*, 48(4), 427–437.
- Braasch, I., Peterson, S. M., Desvignes, T., McCluskey, B. M., Batzel, P., & Postlethwait, J. H. (2015). A new model army: Emerging fish models to study the genomics of vertebrate Evo-Devo. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 324(4), 316–341.
- Brand, M., Granato, M., & Nüsslein-Volhard, C. (b.r.). Keeping and raising Zebrafish. In *Zebrafish* (2002). Oxford University Press.
- Britz, R., Kirschbaum, F., & Heyd, A. (2000). Observations on the structure of larval attachment organs in three species of gymnotiforms (Teleostei, Ostariophysi). *Acta Zoologica*, 81, 57–67.
- Butts, T., Holland, P. W. H., & Ferrier, D. E. K. (2010). Ancient homeobox gene loss and the evolution of chordate brain and pharynx development: deductions from amphioxus gene expression. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20100647.
- Candiani, S., Holland, N. D., Oliveri, D., Parodi, M., & Pestarino, M. (2008). Expression of the amphioxus *Pit-1* gene (*AmphiPOU1F1/Pit-1*) exclusively in the developing preoral organ, a putative homolog of the vertebrate adenohipophysis. *Brain Research Bulletin*, 75(2), 324–330.
- Collazo, A., Bolker, J. A., & Keller, R. (1994). A Phylogenetic Perspective on Teleost Gastrulation. *The American Naturalist*, 144(1), 133–152.

- Conklin, E. G. (1932). The embryology of amphioxus. *Journal of morphology*, 54(1), 69–151.
- Couly, G., Creuzet, S., Bennaceur, S., Vincent, C., & 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(4), 1061–1073.
- Crawford, A. J., & Wake, D. B. (1998). Phylogenetic and evolutionary perspectives on an enigmatic organ: the balancer of larval caudate amphibians. *Zoology*, 101, 107–123.
- Crkvová, B. (2012). Komparativní vývojová morfogeneze vnějších žaber obratlovců. PřF UK v Praze, diplomová práce. Získáno z <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/45407>
- de Bernardi, F., & Fascio, U. (1994). Possibile omologia tra gli organi adesivi di ascidie e di anfibi, 128, 441–449.
- Dettlaff, T. A., Ginsburg, A. S., & Schmalhausen, O. I. (1993). *Sturgeon Fishes - Developmental Biology and Aquaculture*. Springer.
- Dickinson, A. J. G., & Sive, H. (2006). Development of the primary mouth in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 295(2), 700–713.
- Dickinson, A., & Sive, H. (2007). Positioning the extreme anterior in *Xenopus*: Cement gland, primary mouth and anterior pituitary. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(4), 525–533.
- Diedhiou, S., & Bartsch. (2009). Staging of the Early Development of Polypterus (Cladistia:Actinopterygii). In Y. W. Kunz, C. A. Luer, & B. G. Kapoor, *Development of Non-Teleost Fishes*. Science Publishers.
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians* (Johns Hopkins Paperback editions). The Johns Hopkins University Press.
- Eycleshymer, A. C., & Wilson, J. M. (b.r.). The adhesive organs of *Amia*. *Biological Bulletin*, (14), 134–149.
- Fox, H. (1985). Balancer Fine Structure of the Pleurodeles Larva. *Acta Zoologica*, 66(2), 97–110.
- Frankenberger, Z. (1927). Über die morphologische Bedeutung der Haftorgane bei den Larven einiger niederer Vertebraten, 69, 171–180.
- Froese, R., & Pauly, D. (b.r.). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (06/2017), 2017.
- Gamill, L., & Sive, H. (2000). Coincidence of otx2 and BMP4 signaling correlates with *Xenopus* cement gland formation, 92, 217–226.
- Garstang, W. (1928). Memoirs: The Morphology of the Tunicata, and its Bearings on the Phylogeny of the Chordata. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 2(285), 51–187.
- Gibbs, M. A. (2004). Lateral Line Receptors: Where Do They Come from Developmentally and Where Is Our Research Going? *Brain, Behavior and Evolution*, 64(3), 163–181.
- Giles, S., Xu, G.-H., Near, T. J., & Friedman, M. (2017). Early members of ‘living fossil’ lineage imply later origin of modern ray-finned fishes. *Nature*, 549(7671), 265–268.
- Gillis, J. A., & Tidswell, O. R. A. (2017). The Origin of Vertebrate Gills. *Current Biology*, 27(5), 729–732.
- Groppelli, S., Pennati, R., Sotgia, C., & Bernardi, F. D. (2003). Cement gland apparatus of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Teleostei, Cichlidae): Functional morphology in comparison with adhesive organs of other Chordata. *Italian Journal of Zoology*, 70(2), 133–139.
- Hall, B. K., & Kerney, R. (2011). Levels of Biological Organization and the Origin of Novelty. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 318(6), 428–437.

- Hassoun, R., Püschel, B., & Viebahn, C. (2010). *Sox17* Expression Patterns during Gastrulation and Early Neurulation in the Rabbit Suggest Two Sources of Endoderm Formation. *Cells Tissues Organs*, 191(2), 68–83.
- Hemmati-Brivanlou, E. H. A. (1996). In Vivo Evidence for Trigeminal Nerve Guidance by the Cement Gland in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 178(2), 363–374.
- Hockman, D., Burns, A. J., Schlosser, G., Gates, K. P., Jevans, B., Mongera, A., ... Baker, C. V. H. (b.r.). Evolution of the hypoxia-sensitive cells involved in amniote respiratory reflexes. *eLife*, 6.
- Chapman, S. C., Matsumoto, K., Cai, Q., & Schoenwolf, G. C. (2007). Specification of germ layer identity in the chick gastrula. *BMC Developmental Biology*, 7, 91.
- Inohaya, K., Yasumasu, S., Ishimaru, M., Ohyama, A., Iuchi, I., & Yamagami, K. (1995). Temporal and Spatial Patterns of Gene Expression for the Hatching Enzyme in the Teleost Embryo, *Oryzias latipes*. *Developmental Biology*, 171(2), 374–385.
- Jacobson, A. G., Miyamoto, D. M., & Mai, S.-H. (1979). Rathke's pouch morphogenesis in the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*, 207(3), 351–366.
- Jacox, L., Sindelka, R., Chen, J., Rothman, A., Dickinson, A., & Sive, H. (2014). The extreme anterior domain is an essential craniofacial organizer acting through kinin-kallikrein signaling. *Cell reports*, 8(2), 596–609.
- Kerr, J. G. (1900). The External Features in the Development of *Lepidosiren paradoxa*, Fitz. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 192, 299–330.
- Kerr, J. G. (1907). The development of *Polypterus senegalus* Cuv. In *The work of John Samuel Budgett*. Cambridge: University Press.
- Kerr, J. G. (John G. (1919). *Text-book of embryology*. London, MacMillan. Získáno z <http://archive.org/details/textbookofembryo02ker/ruoft>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310.
- Kostomarov, A. A. (1991). The loach *Misgurnus fossilis*. *Animal Species for Developmental Studies*, 125–144.
- 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(7), 911–933.
- Long, W. L., & Ballard, W. W. (2001). Normal embryonic stages of the Longnose Gar, *Lepisosteus osseus*. *BMC Developmental Biology*.
- Metscher, B. D. (2009). MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology*, 9(1), 11.
- Minařík, M. (2009). Vývojová morfogeneze příchytých žláz a orgánů u nižších obratlovců. PřF UK Praze, bakalářská práce. Získáno z <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/24498>
- Minařík, M. (2011). Vývojová morfogeneze příchytých žláz a orgánů u nižších obratlovců. PřF UK Praze, diplomová práce. Získáno z <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/48322>
- Minarik, M., Stundl, J., Fabian, P., Jandzik, D., Metscher, B. D., Psenicka, M., Gela, D., Osorio-Pérez, A., Arias-Rodriguez, L., Horáček, I., Cerny, R. (2017). Pre-oral gut contributes to facial structures in non-teleost fishes. *Nature*, 547(7662), 209–212.
- Modrell, M. S., Bemis, W. E., Northcutt, R. G., Davis, M. C., & Baker, C. V. H. (2011). Electrosensory ampullary organs are derived from lateral line placodes in bony fishes. *Nature Communications*, 2, 496.

- Monga, G., Canese, M. G., & Bussolati, G. (1972). Electron microscopical demonstration of sulphated mucopolysaccharides in mouse tracheal cartilage with a diaminobenzidine-osmium tetroxide technique. *The Histochemical Journal*, 4(3), 205–211.
- Muenke, M., & Beachy, P. A. (2000). Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(3), 262–269.
- Nagasawa, T., Kawaguchi, M., Yano, T., Sano, K., Okabe, M., & Yasumasu, S. (2016). Evolutionary Changes in the Developmental Origin of Hatching Gland Cells in Basal Ray-Finned Fishes. *Zoological Science*, 33(3), 272–281.
- Near, T. J., Eytan, R. I., Dornburg, A., Kuhn, K. L., Moore, J. A., Davis, M. P., ... Smith, W. L. (2012). Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13698–13703.
- Nieuwkoop, P. D., & Faber, J. (1956). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*, 22.
- Nokhbatolfoghahai, M., & Downie, J. R. (2005). Larval Cement Gland of Frogs: Comparative Development and Morphology. *Journal of Morphology*, 263, 270–283.
- Oisi, Y., Ota, K. G., Kuraku, S., Fujimoto, S., & Kuratani, S. (2013). Craniofacial development of hagfishes and the evolution of vertebrates. *Nature*, 493(7431), 175–180.
- Parker, K. M. (1917). The Development of the Hypophysis Cerebri, Pre-Oral Gut, and Related Structures in the Marsupialia. *Journal of Anatomy*, 51(Pt 3), 181–249.
- Pennati, R., Bolzern, A. M., Gropelli, S., Sotgia, C., & de Bernardi, F. (2000). The adhesive organs of Anura: a histological and molecular study. *Italian Journal of Zoology*, 67, 1–8.
- Pera, E. M., & Kessel, M. (1997). Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate. *Development*, 124(20), 4153–4162.
- Picard, J. J. (1975a). *Xenopus laevis* cement gland as an experimental model for embryonic differentiation: I. In vitro stimulation of differentiation by ammonium chloride. *Journal of embryology and experimental morphology*, 33(4), 957–967.
- Picard, J. J. (1975b). *Xenopus laevis* cement gland as an experimental model for embryonic differentiation: II. The competence of embryonic cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 33(4), 969–978.
- Pottin, K., Hyacinthe, C., & Rétaux, S. (2010). Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish *Astyanax mexicanus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17256–17261.
- Qu, Q., Haitina, T., Zhu, M., & Ahlberg, P. E. (2015). New genomic and fossil data illuminate the origin of enamel. *Nature*, 526(7571), 108–111.
- Rand, R. (1917). On the relation of the head chorda to the pharyngeal epithelium in the pig embryo: A contribution to the development of the bursa pharyngea and the tonsilla pharyngea. *The Anatomical Record*, 13(7), 465–491.
- Reiss, J. O. (1997). Early development of chondrocranium in the tailed frog *Ascaphus truei* (Amphibia: Anura): implications for anuran palatoquadrate homologies. *Journal of morphology*, 231(1), 63–100.
- Rétaux, S., & Pottin, K. (2011). A question of homology for chordate adhesive organs. *Communicative & integrative biology*, 4(1), 75–77.
- Roberts, A., & Blight, A. R. (1975). Anatomy, physiology and behavioural role of sensory nerve endings in the cement gland of embryonic *Xenopus*. *Proceedings of the Royal Society, Section B*, 192, 111–127.
- Satoh, N., Tagawa, K., Lowe, C. J., Yu, J.-K., Kawashima, T., Takahashi, H., ... Gerhart, J.

- (2014). On a possible evolutionary link of the stomochord of hemichordates to pharyngeal organs of chordates. *Genesis*, 52(12), 925–934.
- Sauka-Spengler, T., Germot, A., Shi, D., & Mazan, S. (2002). Expression patterns of an Otx2 and an Otx5 orthologue in the urodele *Pleurodeles waltl*: implications on the evolutionary relationships between the balancers and cement gland in amphibians. *Development genes and evolution*, 212(8), 380–387.
- Seessel, A. (1877). Ztir Entwickluigsgeschichte des Vorderdarms. *Archiv für Anatomie und Physiologie, Anatomische Abteilung, 1877*.
- Seifert, R., Jacob, M., & Jacob, H. J. (1993). The avian prechordal head region: a morphological study. *Journal of anatomy*, 183(Pt 1), 75.
- Selleck, M. A., & Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development*, 121(2), 525–538.
- Shi, X., Luo, Y., Howley, S., Dzialo, A., Foley, S., Hyde, D. R., & Vihelic, T. S. (2006). Zebrafish foxe3: Roles in ocular lens morphogenesis through interaction with pitx3. *Mechanisms of Development*, 123(10), 761–782.
- Schweickert, A., Steinbeisser, H., & Blum, M. (2001). Differential gene expression of *Xenopus* Pitx1, Pitx2b and Pitx2c during cement gland, stomodeum and pituitary development. *Mechanisms of development*, 107(1), 191–194.
- Schwind, J. L. (1928). The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Developmental Dynamics*, 41(2), 295–319.
- Sive, H., & Bradley, L. (1996). A Sticky problem: The *Xenopus* Cement Gland as a Paradigm for Anteroposterior Patterning. *Developmental Dynamics*, 205, 265–280.
- Sotgia, C., Fascio, U., Melone, G., & de Bernardi, F. (1998). Adhesive Papillae of *Phallusia mamillata* Larvae: Morphology and Innervation. *Zoological Science*, 15, 363–370.
- Soukup, V., Epperlein, H.-H., Horáček, I., & Cerny, R. (2008). Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature*, 455(7214), 795–798.
- Soukup, V., Horáček, I., & Cerny, R. (2013). Development and evolution of the vertebrate primary mouth. *Journal of Anatomy*, 222(1), 79–99.
- Stern, C. (Ed.). (2004). *Gastrulation: From Cells to Embryo* (1st edition). Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stone, L. M., Finger, T. E., Tam, P. P., & Tan, S. S. (1995). Taste receptor cells arise from local epithelium, not neurogenic ectoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(6), 1916–1920.
- Striedter, G. F., & Northcutt, R. G. (1991). Biological Hierarchies and the Concept of Homology. *Brain, Behavior and Evolution*, 38(4–5), 177–189.
- Suda, Y., Kurokawa, D., Takeuchi, M., Kajikawa, E., Kuratani, S., Amemiya, C., & Aizawa, S. (2009). Evolution of Otx paralogue usages in early patterning of the vertebrate head. *Developmental Biology*, 325, 282–295.
- Swindell, E. C., Zilinski, C. A., Hashimoto, R., Shah, R., Lane, M. E., & Jamrich, M. (2008). Regulation and function of foxe3 during early zebrafish development. *Genesis*, 46(3), 177–183.
- Takeuchi, M., Takahashi, M., Okabe, M., & Aizawa, S. (2009). Germ layer patterning in bichir and lamprey; an insight into its evolution in vertebrates. *Developmental Biology*, 332(1), 90–102.
- True, J. R., & Haag, E. S. (2001). Developmental system drift and flexibility in evolutionary trajectories. *Evolution & development*, 3(2), 109–119.
- Veeman, M. T., Newman-Smith, E., El-Nachef, D., & Smith, W. C. (2010). The ascidian mouth opening is derived from the anterior neuropore: Reassessing the mouth/neural tube relationship in chordate evolution. *Developmental Biology*, 344(1), 138–149.

Wang, Y., Zhang, P.-J., Yasui, K., & Saiga, H. (2002). Expression of Bhlx3, a LIM-homeobox gene, in the development of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Mechanisms of Development*, 117(1), 315–319.

Wardle, F. C., & Sive, H. L. (2003). What's your position? The *Xenopus* cement gland as a paradigm of regional specification. *BioEssays*, 25, 717–726.

Yoshida, K., Ueno, M., Niwano, T., & Saiga, H. (2012). Transcription regulatory mechanism of Pitx in the papilla-forming region in the ascidian, *Halocynthia roretzi*, implies conserved involvement of Otx as the upstream gene in the adhesive organ development of chordates. *Development, Growth & Differentiation*, 54(6), 649–659.

Yu, J.-K., Holland, L. Z., Jamrich, M., Blitz, I. L., & Holland, N. D. (2002). AmphiFoxE4, an amphioxus winged helix/forkhead gene encoding a protein closely related to vertebrate thyroid transcription factor-2: expression during pharyngeal development. *Evolution & Development*, 4(1), 9–15.

9. Přiložená publikace

Minarik, M., Stundl, J., Fabian, P., Jandzik, D., Metscher, B. D., Psenicka, M., Gela, D., Osorio-Pérez, A., Arias-Rodriguez, L., Horáček, I., Cerny, R. (2017). Pre-oral gut contributes to facial structures in non-teleost fishes. *Nature*, 547(7662), 209–212.