

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie**

**Charles University, Faculty of Science
Department of Zoology**

Doktorský studijní program: Zoologie
Doctoral study programme: Zoology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Doctoral thesis



Vývoj, evoluce a homologie přichytných žláz a orgánů nižších obratlovců

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

Mgr. Martin Minařík

Školitel/Supervisor:
Mgr. Robert Černý, Ph.D.

Praha, 2017

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

1. Úvod

Cementové orgány jsou specializované struktury na hlavě embryí a larev mnoha skupin obratlovců. Jedná se zpravidla o shluky vysoce specializovaných sekretorických buněk (Groppelli *et al.*, 2003), jež umožňují larvám ihned po vylíhnutí pevné přichycení na vhodném substrátu (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005). Nejlépe prostudovaným orgánem tohoto typu je cementová žláza drápatky (Dickinson & Sive, 2007). Žlázy ostatních zástupců žab se však od modelového příkladu v mnohém liší (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2005). Mimo samotné žáby variabilita dále narůstá, což znesnadňuje úvahy o případné homologii. Už Frankenberger (Frankenberger, 1927) vyslovil názor, že homologické sekretorické žlázy nacházíme u kopinatce (*Branchiostoma*). Do podobné souvislosti byly dávány i ektodermální adhezivní papily sumek (Yoshida *et al.*, 2012), či orgány bahníků (Kerr, 1900), případně kostnatých (Rétaux & Pottin, 2011; Groppelli *et al.*, 2003). Žlázy všech paprskoploutvých se nicméně zakládají dorzálně od úst (Minařík, 2011), zatímco u drápatky vznikají ventrálně od stomodea v rámci extrémně anteriorní domény, tedy místa kontaktu ektodermu a entodermu orální oblasti (Dickinson & Sive, 2007). U všech skupin žlázy nicméně vznikají z ektodermu a vykazují shodnou senzickou inervaci (Roberts & Blight, 1975; Crawford & Wake, 1998; Groppelli *et al.*, 2003) a také expresi genů *pitx2* a *otx2/5* (Hall & Kerney, 2011; Yoshida *et al.*, 2012) a *bmp4* (Gamill & Sive, 2000).

J. Graham Kerr nicméně v roce 1907 popsal cementové orgány bichira senegalského (*Polypterus senegalus*) jako deriváty předního hlavového entodermu (Kerr, 1907), což by homologii v klasickém slova smyslu vylučovalo (viz také Eycleshymer & Wilson, 1908). Přestože vznikají v entodermu, zakládají se však cementové orgány bichira právě v rámci u drápatky popsané extrémně anteriorní domény, na styku entodermu s anteriorním ektodermem (Minařík, 2011). Entodermální původ cementových orgánů bichira je nicméně v rozporu s dosavadními představami o vývoji hlavového entodermu obratlovců, pro jakékoli úvahy o jejich homologii je tak nejprve nutné detailní poznání jejich morfogeneze u těchto ryb.

2. Cíle práce

1. Doplnění základních poznatků o vzniku cementových žláz u studovaných organismů.
2. Experimentální ověření entodermálního původu cementových orgánů bichira, případně dalších druhů.
3. Studium diferenciací hlavového entodermu pomocí Micro-CT.
4. Srovnání exprese genů klíčových pro vznik cementových orgánů bichira a drápatky metodou RNA *in situ* hybridizace.
5. Posouzení stávajících hypotéz o evoluci cementových orgánů obratlovců.

3. Materiál a metodika

Embrya bichira byla senegalského (*Polypterus senegalus*) získána z chovů katedry zoologie. Výtěry jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) probíhaly ve VÚRH ve Vodňanech v laboratoři Martina Pšeničky. Embrya kostlína mexického (*Atractosteus tropicus*) byla získána v

laboratoři Lenina Ariase Rodrigueze v mexické Villahermose. Na všech třech pracovištích byl fixován materiál pro následné elektronmikroskopické, histologické a imunohistochemické analýzy a detekci cementových orgánů pomocí barvení PAS. Zároveň byly přímo na místě prováděny *in vivo* fate-mapping experimenty. Do základních analýz byla mimo zmiňovaných druhů pro srovnání zahrnuta také skalára amazonská (*Pterophyllum scalare*) a drápatka vodní (*Xenopus laevis*).

In vivo experimentální testování schopnosti cementové žlázy atrahovat rostoucí axony probíhalo v Marine Biological Laboratory ve Woods Hole, USA. Hostitelským embryím byla transplantována ektopická žláza do žaberní oblasti a následně analyzovány změny v průběhu inervace. Inervace byla detekována imunohistochemicky a vizualizována pod stereomikroskopem či s pomocí Micro-CT. V rámci srovnání cementových orgánů bichira se situací u drápatky byla studována exprese klíčových transkripčních faktorů pomocí RNA *in situ* hybridizace.

Zárodečný původ cementových orgánů bazálních paprskoploutvých byl testován pomocí injekce fluorescenční značky CM-Dil. Naplnění dutiny prvostřeva CM-Dil skrze otevřenou neurální ploténku umožnilo specificky označit buňky entodermu a sledovat jejich příspěvek do povrchových struktur. Ten byl během stáže v laboratoři Briana Metschera na Vídeňské univerzitě studován také s pomocí Micro-CT.

4. Výsledky a diskuse

Barvení pomocí PAS umožnilo spolehlivou lokalizaci plně vyvinutých cementových orgánů. U jesetera, u něhož k larvální adhezi nedochází, namísto cementové žlázy vzniká takzvaná *hatching gland* (Bolker, 2004), tedy žláza usnadňující líhnutí enzymatickým rozrušením vaječných obalů. Inervaci cementových orgánů u všech druhů v souladu s poznatky u drápatky zajišťuje maxilární nerv. Přestože inervace byla používána jako argument pro i proti homologii cementových žláz (Rétaux & Pottin, 2011; Crawford & Wake, 1998), provedený experiment na drápatce ukazuje, že žláza axony aktivně atrahuje i mimo původní kontext.

Injekce CM-Dil do dutiny prvostřeva u bichira a kostlína ukazuje přítomnost entodermu přímo v sekretorickém epitelu cementového orgánu. Vibratomové řezy značenými embryi jesetera jasně ukazují, že entoderm u tohoto druhu tvoří výstelku dutiny ústní včetně zubů, a dále proniká na povrch kde zakládá dva páry hmatových vousů, vně úst a přispívá do široké epiteliální domény v mediální části zakládajícího se rostra. **Je tedy zřejmé, že u bazálních paprskoploutvých se na vývoji cementových orgánů podílí speciální populace buněk entodermu. Tyto entodermální buňky pronikají na povrch, kde komunikují s vnějším prostředím, což je v rámci obratlovců zcela unikátní a představuje tak první důkaz extenzivního entodermálního příspěvku do vnějšího povrchu hlavy.**

Následné snímání pomocí Micro-CT u bichira a kostlína ukazuje, že se již záhy po neurulaci tvoří v entodermu párové výchlípky, jež jsou jednoznačným pokračováním nejpřednějšího konce střeva. Ty se nápadně zvětšují a před líhnutím se již viditelně otvírají do vnějšího prostředí jakožto funkční cementové žlázy. Na základě jejich preorální pozice tak dále tyto výchlípky nazýváme předústním střevem. U jesetera je výchlípka předústního střeva nepárová a odpovídá doméně na bázi rostra, popsané na základě CM-Dil značení. **Micro-CT data tak 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.

Cementové orgány bichira poněkud překvapivě exprimují jak již v literatuře dříve popsany *otx5* (Suda *et al.*, 2009), tak také *pitx2*, tedy transkripční faktory klíčové pro vznik cementové žlázy kostnatých (Pottin *et al.*, 2010) či drápatky (Dickinson & Sive, 2007). *Bmp4* stejně jako u drápatky chybí v orální oblasti a naproti tomu je exprimován v ektodermální doméně ventrálně těsně sousedící s primordií cementových orgánů. Příslušná *pitx2*-pozitivní oblast nejanteriornějšího entodermu předústního střeva přitom tvoří entodermální komponentu extrémně anteriorní domény popsané u drápatky, což naznačuje možnost přesunu kompetence k tvorbě sekretorických buněk mezi ektodermem a těsně sousedícím entodermem v evoluci těchto orgánů. Již dříve byl popsán duální ekto- a entodermální původ zubů u axolotla (Soukup *et al.*, 2008) či vznik chuťových pohárků u myši (Stone *et al.*, 1995). Pro podobné případy, kdy je bez viditelných fenotypových změn na plně vyvinutém orgánu možno prokázat posun v souvisejících vývojových procesech, se v nedávné době vžilo označení developmental system drift (True & Haag, 2001). Případný homolog entodermálních žláz bazálních paprskoploutvých je tak nutno hledat v mnohem širším kontextu ontogeneze hlavy.

Na raná stádia vývoje předústního střeva jesetera jasně upomíná takzvaný *polster* kostnatých (Inohaya *et al.*, 1995; Swindell *et al.*, 2008), jenž dává stejně jako u jesetera vzniknout takzvané *hatching gland*, sloužící k rozrušení zárodečných obalů a u kostnatých tradičně považované za derivát takzvané prechordální destičky (Swindell *et al.*, 2008). Její redukce na masu mezentodermálních buněk je zřejmě důsledkem absence archentera u kostnatých – stejný proces je v náznaku přítomen už u jesetera, kde se v důsledku sekundární komprese prvostřeva charakter výchlípký mění z epiteliálního váčku v pouhou ztluštěninu klínovitého tvaru. Typické předústní střevo bylo naproti tomu popsáno na histologických řezech orální oblasti žáby ocasatky *Ascaphus truei* (Reiss, 1997). U amniot se v nejanteriornější část entodermu vyvíjí tzv. Seesselova výchlípka, vznikající jako ztluštěnina entodermálního epitelu, prechordální destička (Seifert *et al.*, 1993; srov. situaci u kostnatých), jejíž buňky posléze migrují mezi bázi mozku a strop stomodea. Tato situace nápadně upomíná na shodně lokalizované předústní střevo ocasatky i bazálních paprskoploutvých a nahrává tak představě, že předústní střevo existovalo už u společného předka paprskoploutvých a svaloploutvých. Nápadně podobným vývojem jako u amniot prochází anteriorní struktury vyvíjející se hlavy taktéž u žraloka *Scyliorhinus torazame* (Adachi & Kuratani, 2012; Adachi *et al.*, 2012) a sliznatky *Eptatretus burgeri* (Oisi *et al.*, 2013), což by posouvalo původ předústního střeva ještě hlouběji v evoluci obratlovců.

Pravděpodobné vysvětlení redukce epiteliálních výchlípek předústního střeva na mezenchymatickou prechordální destičku skýtá meroblastické rýhování kostnatých, amniot, žraloků a sliznatek (Collazo *et al.*, 1993) v jehož důsledku se nevyvíjí archenteron a dutina trávicí trubice vzniká až sekundárně. **Holoblastické rýhování s výraznou dutinou archentera je původní pro všechny obratlovce (Collazo *et al.*, 1993). Ancestrální morfogeneze předústního střeva se tedy nejspíše odehrávala způsobem podobným situaci u bazálních paprskoploutvých.** Původnosti popisovaných procesů nahrává také dynamika nejanteriornějšího entodermu kopinatce, u kterého se vytváří pár entodermálních výchlípek (levé a pravé Hatschekovo divertikulum) velmi podobným způsobem, jaký byl popsán u bichira (Conklin, 1932), a dále takzvaná kyjovitá žláza (*club-shaped gland*), jež s cementovými orgány bichira či kostlína sdílí taktéž produkci mukózního sekretu a expresi genu *foxe4* (Yu *et al.*, 2002). Taktéž stomochord polostrunatců, dlouho považovaný za homolog notochordu strunatců, exprimuje celou řadu typicky entodermálních genů včetně

foxe, a vzniká jakožto epiteliální výchlípka anterodorzální stěny faryngu, tedy ve stejné pozici jako výše zmiňované struktury (Satoh *et al.*, 2014).

Předústní střevo tedy prostřednictvím *hatching gland* jesetera jasně sdílí evoluční kontinuitu s *polsterem*, respektive prechordální destičkou kostnatých. Zároveň embryonálním kontextem svého vzniku jasně odkazuje na prechordální destičku amniot, žraloků a sliznatek, jejíž mezenchymatický charakter může být důsledkem odvozeného meroblastického rýhování u těchto skupin. **Dohromady tyto poznatky naznačují, že předústní střevo může představovat znak společný všem obratlovcům, mající svůj evoluční původ u bezobratlých strunatců či dokonce druhoústých.**

5. Závěr

Předkládaná práce experimentálně prokázala entodermální zárodečný původ cementových orgánů bichira a kostlína, stejně jako *hatching gland* jesetera. Všechny tyto orgány vznikají z výchlípek předústního střeva, v entodermu extrémně anteriorní embryonální domény (Dickinson & Sive, 2007) a shodně exprimují transkripční faktory s ní asociované. Předústní střevo je prvním detailně doloženým příkladem entodermálního původu povrchových struktur hlavy. Zatímco doposud bez výjimky platilo, že k fúzi ektodermálního epitelu s hlavovým entodermem dochází výlučně v kontextu úst a faryngu, předkládaná práce přidává právě předústní střevo jako nové, nejranější ekto-entodermální rozhraní.

Popsaný způsob morfogeneze je ancestrální všem paprskoploutvým rybám. Rudimentární prechordální destička kostnatých dává vzniknout takzvané *hatching gland* (Swindell *et al.*, 2008) a je zjevně homologická s předústním střevem. Také prechordální destička sliznatek, žraloků či amniot odpovídá svým vznikem rudimentárnímu předústnímu střevu. Mezenchymatický charakter morfogeneze prechordální destičky může být způsoben odvozeným vývinem embryí zmiňovaných skupin z telolecitálního vajíčka (Collazo *et al.*, 1993). Mesolecitální vajíčko bazálních paprskoploutvých a následná gastrulace zahrnující vznik prostorné dutiny prvostřeva představuje předpokládaný 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. Vzhledem k existenci podobných faryngeálních struktur u kopinatce a polostrunatců (Conklin, 1932; Satoh, 2014) je tak možné, že zde popsán vznik předústního střeva odkazuje na vývojové procesy přítomné u společného předka všech strunatců, či dokonce druhoústých.

1. Introduction

Cement glands are specialized structures that develop on larval heads in many vertebrate lineages. They usually form as an aggregation of highly specialized secretory cells (Groppelli *et al.*, 2003), which allow the larvae to attach to a substrate (Nohbatolfoghahai & Downie, 2005). The best studied example of this kind of structures is the cement gland of xenopus (Dickinson & Sive, 2007). Cement glands of other frog species however substantially differ in terms of morphology (Nohbatolfoghahai & Downie, 2005). In other vertebrate lineages the diversity is even greater, which renders any attempts to assess their homology rather difficult. Frankenberger was among the first to suggest that homologous glands exist in amphioxus (Frankenberger, 1927). Similarly, ectodermal adhesive papillae of ascidians (Yoshida *et al.*, 2012), cement glands of dipnoans (Kerr, 1900), or teleosts (Rétaux & Pottin, 2011; Groppelli *et al.*, 2003), have been homologized with those of frogs. In all ray-finned fishes, cement glands however arise above mouth (Minařík, 2011), whereas xenopus cement gland develops within the ectoderm of the so-called extreme anterior domain (Dickinson & Sive, 2007) ventral to the mouth. Despite these differences, cement glands seem to share an ectodermal origin, sensory innervation (Roberts & Blight, 1975; Crawford & Wake, 1998; Groppelli *et al.*, 2003), and expression of *pitx2* and *otx2/5* (Hall & Kerney, 2011; Yoshida *et al.*, 2012) and also *bmp4* (Gamill & Sive, 2000).

J. Graham Kerr however described cement organs of Senegal bichir (*Polypterus senegalus*) as derivatives of anterior head endoderm (Kerr, 1907), which would contradict the standard view on homology of these organs (see also Eycleshymer & Wilson, 1908). Despite their endodermal origin, bichir cement glands arise within the extreme anterior domain, at the ecto-endodermal contact zone (Minařík, 2011). Endodermal origin of bichir cement glands is however in a sharp contrast with current knowledge on head endoderm development in vertebrates. To allow subsequent considerations of the possible homology of the cement glands among vertebrates it is thus crucial to first understand their morphogenesis in this lineage.

2. Aims of the study

1. To perform basic analyses of cement gland development in the studied species.
2. To experimentally test the possibility of endodermal origin of cement glands in bichir or other species.
3. To analyze head endoderm morphogenesis using Micro-CT
4. To perform comparative gene expression analysis of bichir and xenopus cement gland using RNA *in situ* hybridization.
5. To assess present hypotheses of cement gland homology.

3. Material and methods

Embryos of Senegal bichir (*Polypterus senegalus*) were obtained from the colony at the Department of Zoology. Sterlet (a sturgeon, *Acipenser ruthenus*) spawnings were performed in Martin Pšenička's lab at RIFCH in Vodňany. Tropical gar (*Atractosteus tropicus*) embryos were collected in Lenin Arias Rodriguez's lab in Villahermosa, Mexico. In all three facilities,

embryonic material was fixed for later use in SEM, histological, immunohistochemical and other analyses, including mucopolysaccharide detection using PAS staining. *In vivo* fate-mapping experiments were performed at the same time. During the initial analyses, freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*) and African clawed frog (*Xenopus laevis*) were used as reference species.

In vivo verification of the ability of the cement gland to actively attract axon growth was performed in Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA. Ectopic cement gland was transplanted to the branchial region of the host embryos and the resulting changes in innervation patterns were analyzed immunohistochemically. Cement gland innervation was also studied using Micro-CT imaging. The expression of key transcription factors in bichir cement glands was studied using RNA *in situ* hybridization, to compare the expression patterns with the well known situation in xenopus.

Germ layer origin of cement glands in basal actinopterygians was analyzed using *in vivo* injection of CM-Dil fluorescent cell tracker. Archenteric cavity was filled with the dye via the open neural plate, which allowed to specifically stain the endoderm and follow its contribution to head structures. Head endoderm morphogenesis was also studied using Micro-CT imaging during my stay in Brian Metscher's lab in Vienna.

4. Results and discussion

PAS staining allowed us to locate the fully developed cement glands in the analyzed species. In sturgeon, the larvae do not adhere, and the embryos develop the so-called hatching gland instead (Bolker, 2004), which allows them to hatch from the eggs by enzymatic digestion of their shells. Cement glands in all species were innervated by the maxillary nerve, similarly to xenopus. Although innervation patterns have been used either to support or to refuse cement gland homology (Rétaux & Pottin, 2011; Crawford & Wake, 1998), experiments with ectopic gland in xenopus show that it can attract axon growth even out of its original context.

CM-Dil injections into the archenteric cavity in bichir and gar reveal endodermal origin of cement gland secretory epithelium. Vibratome sections in sturgeon clearly show the presence of endodermal cells in the epithelia of oral cavity including teeth, but also their contribution to external structures such as two pairs of sensory barbels and a wide epithelial domain at the medial part of ventral rostral surface. **This evidence clearly demonstrates that a population of endodermal cells contributes to the cement gland development in basal actinopterygians. These cells emerge at the embryonic surface where they interact with the outer environment, a situation unique among vertebrates. These data thus represent a first thorough evidence of endodermal origin of external structures on the head.**

Subsequent Micro-CT imaging of bichir and gar reveals an early bilateral pouching of the endoderm soon after neurulation. These pouches, which represent a clear continuation of the archenteric cavity, later expand to fuse with the ectoderm before hatching to become a functional cement glands. According to their preoral position we describe these pouches as a preoral gut. In sturgeon, there is only a single, medially located pouch, which corresponds to the endodermal domain detected by fate-mapping experiments. **The Micro-CT data thus clearly demonstrate the preoral gut as a distinct domain within the head endoderm, which substantially alters the standard scheme of head development in all three**

lineages, and leads to an endodermal contribution to the structures on the external surface of the head.

Surprisingly, bichir cement glands express both *otx5* described in previous studies (Suda *et al.*, 2009), and *pitx2*, two transcription factors which are important for cement gland development in teleosts (Pottin *et al.*, 2010) or xenopus (Dickinson & Sive, 2007). *Bmp4* is expressed in a domain ventrally adjacent to the cement gland primordia, but missing from the oral region, similarly to xenopus. The corresponding *pitx2*-positive domain in the anteriormost endoderm seemingly represents the endodermal component of the extreme anterior domain, as described in xenopus, indicating a possible shift in cement gland initiation between the ectoderm and the immediately adjacent anteriormost endoderm in the course of the evolution of these organs. Dual ecto-endodermal origin was previously described in teeth of axolotl (Soukup *et al.*, 2008) or taste buds of mouse (Stone *et al.*, 1995). In similar situations where a shift in underlying developmental processes is observed without apparent phenotypic changes in the fully differentiated structures, the term developmental system drift has been recently used (True & Haag, 2001). The search for putative cement gland homologues must thus be expanded into a much wider context of the early head development.

Early stages of the preoral gut development in sturgeon have an obvious counterpart in the polster of teleosts (Inohaya *et al.*, 1995; Swindell *et al.*, 2008), which gives rise to the hatching gland which allows the embryos to digest the egg membranes. This gland was traditionally considered to represent a prechordal plate derivative (Swindell *et al.*, 2008). Its reduction to a mass of mesendoderm cells might however result from the absence of archenteric cavity in this lineage. Strikingly similar situation exists in sturgeon, where the epithelial nature of preoral gut gradually changes to a wedge-shaped cluster of cells due to a secondary compression of pharynx. Typical epithelial preoral gut was, on the other hand, described in a basal frog *Ascaphus truei* (Reiss, 1997). In amniotes, the anteriormost endoderm gives rise to the Seessel's pocket, which develops as a thickening in the endodermal epithelium, called a prechordal plate (Seifert *et al.*, 1993, compare with the situation in teleosts). Its cells later migrate anteriorly in between the brain and stomodeal roof in a surprisingly similar way to the preoral gut of *Ascaphus* or basal actinopterygians. It thus seems reasonable to infer the existence of a preoral gut in the last common ancestor of ray-finned fishes and tetrapods. Strikingly similar structures arising in the early head development of the catshark *Scyliorhinus torazame* (Adachi & Kuratani, 2012; Adachi *et al.*, 2012) and the hagfish *Eptatretus burgeri* (Oisi *et al.*, 2013) suggest that the origin of the preoral gut may be nested even deeper in the evolution of vertebrates.

The reduction of the preoral gut from epithelial pouches to mere mesenchyme-like prechordal plate of teleosts, amniotes, sharks, and hagfishes might be explained by the meroblastic cleavage, resulting in the absence of archenteric cavity and a development of secondary gut cavity much later in the development of these lineages (Collazo *et al.*, 1993). **Holoblastic cleavage with a distinct archenteron is ancestral for vertebrates (Collazo *et al.*, 1993). The epithelial morphogenesis of the preoral gut as found in basal actinopterygians might thus represent the ancestral mode of its formation.** This assumption is further supported by similar morphogenesis of the anteriormost endoderm in amphioxus, where paired Hatschek's diverticula form in a way very similar to the situation in bichir (Conklin, 1932). Furthermore, the club-shaped gland resembles bichir and gar cement glands not only by its embryonic origin but also mucus secretion and expression of *foxe4* (Yu *et al.*, 2002). Hemichordate stomochord, previously considered to be homologous to the chordate notochord, which develops as an epithelial outpocketing of the anterodorsal

pharyngeal wall (Satoh *et al.*, 2014), represents another structure developing in the same embryonic context.

Thus, the preoral gut described in the present work clearly shares its evolutionary origin with the teleost polster, or the prechordal plate, respectively. It also shares its embryonic origin with the prechordal plate of amniotes, sharks and hagfishes, in which the mesenchymal nature of this domain may reflect the substantial developmental changes linked to the meroblastic cleavage in these lineages. **Taken together, these results suggest that the preoral gut might represent a character shared among all vertebrates, possibly of non-vertebrate chordate or deuterostome origin.**

5. Conclusions

The present study provides an experimental evidence for the endodermal origin of cement glands in bichir and gar, as well as hatching gland in sterlet. All these structures develop from preoral gut diverticula, in the endoderm of the extreme anterior domain described in xenopus (Dickinson & Sive, 2007) and share the expression of associated transcription factors. Preoral gut represents the first thorough example of endodermal origin of external head structures. While until now the oral and pharyngeal regions were considered to represent the only ecto-endodermal contact zones within head, this work defines the preoral gut as a new, the earliest-developing boundary between these layers.

The described pattern is undoubtedly ancestral to all ray-finned fishes. Rudimentary prechordal plate of Teleosts, which gives rise to the hatching gland (Swindell *et al.*, 2008) is homologous with the preoral gut in basal lineages. The prechordal plate of hagfishes, sharks or amniotes developmentally corresponds to a rudimentary preoral gut as well. The mesenchymal nature of the prechordal plate development may be attributed to the changes in early embryogenesis in these lineages, connected to their derived telolecithal egg (Collazo *et al.*, 1993). The mesolecithal egg of basal actinopterygians resulting in the formation of a distinct archenteric cavity represents the ancestral mode of development in vertebrates (Collazo *et al.*, 1993; Takeuchi *et al.*, 2009) and the same is possible for the epithelial nature of preoral gut development in these lineages. Given the presence of similar pharyngeal structures in the lancelet and hemichordates (Conklin, 1932; Satoh, 2014), it is possible that the morphogenesis of preoral gut revealed in this work reflects ancient developmental processes inherited from the last common ancestor of chordates or even deuterostomes.

Použitá literatura / References

- 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.
- Bolker, J.A. (2004). Embryology. In: LeBreton, G. Sturgeons and paddlefish of North America. *Kluwer Academic Publishers: Dordrecht; Boston*, 2004.
- 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.
- 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.
- 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.
- Eycleshymer, A. C., & Wilson, J. M. (b.r.). The adhesive organs of *Amia*. *Biological Bulletin*, (14), 134–149.
- Frankenberger, Z. (1927). Über die morphologische Bedeutung der Haftorgane bei den Larven einiger niederer Vertebraten, 69, 171–180.
- Gamill, L., & Sive, H. (2000). Coincidence of *otx2* and BMP4 signaling correlates with *Xenopus* cement gland formation, 92, 217–226.
- 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.
- 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.
- 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.
- Minařík, M. (2011). Vývojová morfogeneze přichytných žláz a orgánů u nižších obratlovců. *Diploma thesis*. Charles University, Prague.
- 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.
- 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.
- 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.
- Seifert, R., Jacob, M., & Jacob, H. J. (1993). The avian prechordal head region: a morphological study. *Journal of anatomy*, *183*(Pt 1), 75.
- Soukup, V., Epperlein, H.-H., Horáček, I., & Cerny, R. (2008). Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature*, *455*(7214), 795–798.
- 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.
- 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.
- 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.

Curriculum vitae

Born: 8th June 1987, Zlín, Czech Republic

Affiliation:

Clare Baker's Lab
Department of Physiology, Development and Neuroscience
Anatomy Building, Downing Street
Cambridge, CB2 3DY
United Kingdom

Laboratory for the study of craniofacial evolution & development (Robert Cerny's lab)
Vertebrate zoology research group, Department of Zoology
Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic
Vinická 7, 128 00 Prague 2
Czech Republic

Education:

2011–present: PhD programme in Zoology:

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Zoology
Thesis: *Ontogeny, evolution & homology of cement glands and attachment organs in lower vertebrates*

2009–2011: MSc programme in Zoology (Mgr.):

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Zoology
Thesis: *Developmental morphogenesis of attachment organs in lower vertebrates*

2006–2009: BSc programme in Biology (Bc.):

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Zoology
Thesis: *Developmental morphogenesis of attachment organs in lower vertebrates*

Employment:

Jan 2017–present: Research Associate:

Clare Baker's lab
Department of Physiology, Development and Neuroscience
University of Cambridge, UK

May 2016–present: Research Assistant:

Laboratory for the study of craniofacial evolution & development (Robert Cerny's lab)
Vertebrate zoology research group, Department of Zoology
Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Feb 2016–May 2016: Research Assistant:

Jan Sobotnik's lab

Department of Forest Protection and Entomology
Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Czech
Republic

Educational stays and courses:

Micro-CT Imaging Lab (Brian Metscher's lab)

Department of Theoretical Biology, University of Vienna
(Supported by OeAD Aktion Österreich-Tschechien scholarship, financed by
BMFWF Österreich)
Vienna, Austria, Nov 2014 – Jan 2015

Laboratorio de acuicultura tropical (Lenin Arias Rodriguez's lab)

División académica de ciencias biológicas, Universidad Juárez Autónoma de
Tabasco
Villahermosa, Tabasco, Mexico, Sep 2014, Oct 2015 & Nov 2016

ANGUS: Analyzing High Throughput Sequencing Data

University of California Davis
Davis (CA), USA, Jun – Jul 2017

Introduction to high-throughput sequencing data analysis

University of Cambridge
Cambridge, UK, Mar 2017

Embryology: Concepts & Techniques in Modern Developmental Biology

Marine Biological Laboratory
Woods Hole (MA), USA, Jun – Jul 2015

OIST Winter Course "Evolution of Complex Systems"

Okinawa Institute of Science and Technology
Okinawa, Japan, Dec 2014

12th VBC PhD Symposium: Complexity of Life. Vienna Biocenter, Vienna, Austria,
Nov 2014

11th VBC PhD Symposium: Time - How nature sets the clock. Vienna Biocenter,
Vienna, Austria, Nov 2013

9th VBC PhD Symposium: Think Alternative! Vienna Biocenter, Vienna, Austria,
Nov 2011

34th Advances in Molecular Biology and Genetics. IMG, Czech Academy of
Sciences, Prague, Nov 2010

Grants and scholarships:

GAUK grant no. 726516

Charles University Grant Agency, 2016–2017

(Topic: *Endoderm out of the mouth: evolutionary-developmental analysis of oropharyngeal dynamics in basal fishes*)

GAUK grant no. 220213

Charles University Grant Agency, 2013–2015

(Topic: *Deciphering the evolution of cement organs in ray-finned fishes*)

Aktion Österreich–Tschechien scholarship

OeAD (BMWFV), Austria, autumn semester 2014/2015

(Topic: *Contribution of pharyngeal morphogenesis into embryonic and larval adaptive structures of basal actinopterygian fishes: micro-CT analyses of developmental processes and gene expression patterns*)

STARS scholarship

Charles University in Prague, Faculty of Science, 2011–2015

(Topic: *Ontogeny, evolution & homology of cement glands and attachment organs in lower vertebrates*)

Charles University Mobility Fund

Charles University in Prague, Faculty of Science, Jun/Jul 2015

Memberships:

European Society for Evolutionary Developmental Biology

British Society for Developmental Biology

Genetics Society

Czech Zoological Society

Ichthyology Section of Czech Zoological Society

Czech Herpetological Society

List of publications:

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.

Uhrin, M., Havaš, P., **Minařík, M.**, Kodejš, K., Bugoš, I., Danko, S., Husák, T., Koleska, D., Jablonski, D. (2016). Distribution updates to amphibian and reptile fauna for the Republic of Macedonia. *Herpetology Notes*, 9: 201–220.