

**Univerzita Karlova**  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra zoologie



**Bc. Tereza Matějková**

*Srovnávací a evoluční analýza neurulace  
bazálních ryb*

*Comparative and evolutionary analyses of the neurulation  
in non-teleost fishes*

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Jan Štundl

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze 30. 4. 2018

Na úspěšném sepsání této práce má podíl několik lidí, kterým bych na tomto místě ráda poděkovala.

Robert,

který mi trpělivě pomáhal při mém prvním setkání s vědou.

Honza a všichni ostatní současní i bývalí členové laborky,

kterí mě zásobili nezměrným množstvím roztodivných zkušeností.

Má rodina,

která nevyžaduje, abych byla nejlepší, stačí jí, když jsem šťastná.

Rolf,

who took his time to understand me while struggling with this thesis. That helped me stay calm and happy.

# Abstrakt

Neurulace, neboli vznik neurální trubice, je zásadní událostí embryogeneze každého obratlovce. Tento proces probíhá podle obecného vzoru, kdy se z neurální ploténky v závěru neurulace vytvoří neurální trubice. U většiny skupin obratlovců probíhá neurulace klasicky ohýbáním neurální ploténky za současného vyzdvižení neurálních valů. U kostnatých ryb (*Teleostei*), které reprezentují korunovou skupinu paprskoploutvých ryb (*Actinopterygii*), probíhá neurulace značně rozdílně přes pevný neurální kýl. Tři kmenové linie paprskoploutvých ryb – bichiři, jeseteři a kostlíni – tak mohou sloužit jako unikátní modely pro pochopení evoluční změny ve způsobu neurulace u obratlovců. Pro tento účel byla využita podrobná vývojová série bichira senegalského (*Polypterus senegalus*), jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a kostlína mexického (*Atractosteus tropicus*) a byly porovnány jejich morfogenetické procesy neurulace. Z popisu vnější, tkáňové i buněčné morfologie těchto tří druhů byly zdůrazněny vlivy působící v rámci neurální ploténky (apikální konstriktce, konvergentní extenze) a vlivy okolních tkání na neurální ploténku. Pokusila jsem se také diskutovat případné mechanismy evoluční přechodu od svinování neurální destičky k neurulaci skrze neurální kýl, který představuje unikátní evoluční změnu, se kterou se setkáváme u největší skupiny žijících obratlovců.

# Abstract

Neurulation, i. e. formation of a neural tube, is a crucial event in embryogenesis of each vertebrate. This developmental process is rather stereotypical, generally comprising a transformation of a neural plate into a neural tube. In the majority of vertebrate groups, neurulation classically occurs by a folding process of bending neural folds, whereas in bony fishes (Teleostei), representing a crown group of ray-finned fishes (Actinopterygii), the neurulation occurs rather differently by a solid neural keel. The three stem groups of ray-finned fishes – bichirs, sturgeons and gars – might thus serve as unique models for understanding of evolutionary changes in the pattern of vertebrate neurulation. For that reason, detailed developmental series of bichir (*Polypterus senegalus*), sturgeon (*Acipenser ruthenus*) and gar (*Atractosteus tropicus*) were used, and their morphogenetic processes of neurulation were compared. I present here description of the outer morphology, and analyses of tissue and cellular changes, with a focus on intrinsic forces within the neural plate like apical constriction and convergent extension, as well as on some extrinsic forces. I also try to discuss possible mechanisms of an evolutionary transition from the bending of the neural plate to the neurulation via the neural keel, representing an unique evolutionary change in the vertebrate neurulation.

# Obsah

1. Teoretický úvod .....	1
1.1. Souvislost mezi nervovou soustavou strunatců a larvami skupiny Ambulacraria .....	1
1.2. Stavba nervové soustavy žaludvců.....	2
1.2.1. Homologie stomochordu u žaludvců a chordy u obratlovců.....	3
1.2.2. Evoluční vztahy mezi nervovou soustavou žaludvců a obratlovců.....	4
1.3. Strunatci a jejich trubicovitá nervová soustava.....	6
1.3.1. Neurulace u kopinatce.....	6
1.3.2. Neurulace u pláštěnců.....	9
1.3.2.1. Propojení nervové a trávicí soustavy u pláštěnců.....	10
1.3.2.2. Evoluční vztahy mezi nervovou a trávicí soustavou u pláštěnců.....	12
1.4. Obratlovci coby organismy s nejvíce prozkoumanými procesy neurulace .....	13
1.4.1. Neurulace u obratlovců.....	14
1.4.2. Neurulace u kostnatých ryb.....	16
1.4.3. Primární neurulace .....	17
1.4.4. Vznik neurálního kýlu .....	25
1.4.5. Evoluční vztah mezi primární neurulací a neurálním kýlem.....	26
2. Materiál a metody.....	27
2.1. Fixace.....	27
2.2. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	27
2.3. Histologické řezy .....	28
2.4. Imunohistochemie .....	28
2.5. Analýza materiálu.....	29
3. Výsledky.....	30
3.1. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	30
3.1.1. Vnější morfologie bichira, jesetera a kostlína .....	30
3.2. Histologické řezy (JB-4 pryskyřice).....	31
3.2.1. Histologické řezy neurulami bichira.....	31
3.2.2. Histologické řezy neurulami jesetera.....	33
3.2.3. Histologické řezy neurulami kostlína.....	34
3.2.4. Rozdíly ve stavbě neurálních plotének bichira, jesetera a kostlína.....	35
3.3. Imunohistochemie.....	35
3.3.1. Buněčná stavba během morfogeneze neurální ploténky bichira.....	36
3.3.2. Vznik neurálních valů bichira.....	36
3.3.3. Migrace buněk neurální lišty bichira.....	36
3.3.4. Splývání neurálních valů bichira.....	37
3.3.5. Buněčná stavba během morfogeneze neurální ploténky jesetera.....	37
3.3.6. Buněčná stavba během morfogeneze neurální ploténky jesetera podél anteroposteriorní osy .....	38
3.3.7. Splývání neurálních valů jesetera.....	39
3.3.8. Buněčná stavba neurálního kýlu kostlína.....	39
3.3.9. Buněčná stavba neurálního kýlu kostlína podél anteroposteriorní osy.....	40
3.3.10. Struktury podobné neurálním valům u kostlína .....	41

3.3.11. Buněčná morfogeneze neurálního kýlu kostlína.....	41
3.3.12. Vznik lumen v neurálním kýlu kostlína.....	42
4. Tabule .....	44
5. Diskuze.....	79
5.1. První morfologické rozdíly mezi procesy neurulace.....	79
5.2. Apikální konstriktce, konvergentní extenze, tlak okolních tkání a vliv žloutku coby mechanismy podílející se na procesech neurulace .....	80
5.3. Rozdíly v procesech neurulace podél anteroposteriorní osy.....	82
5.4. Vznik lumen u jednotlivých zástupců bazálních ryb.....	83
5.5. Evoluční přechod od svinování neurální trubice k neurálnímu kýlu.....	84
6. Závěr.....	86
7. Literární zdroje.....	88

## **Zkratky**

AP - anterioposteriorní  
EMT - epitelomezenchymální tranzice  
CNS - centrální nervová soustava  
DMSO - dimethylsulfoxid  
DV – dorzoventrální  
hpo – hodiny po oplození  
MET – mezenchymoepiteliální tranzice  
PBS - fosfátový pufr  
PFA - roztok paraformaldehydu

## **Termíny**

anteriorní – přední, blíže k hlavě  
apikální – vrcholový, u epiteliálních buněk ta část, která není v kontaktu s bazální laminou nebo sousedními buňkami; opak bazální  
apomorfie – znak organismu nebo skupiny organismů, která se nevyskytoval u jejich předků  
bazální – u epiteliálních buněk ta část, která je v kontaktu s bazální laminou; opak apikální  
dorzální - zádová  
epitel – tkáň buněk, které na sebe těsně naléhají a mají minimum mimobuněčné hmoty  
interkalace - vmezeřování  
konstrikce - zúžení  
konvergentní extenze – proces, během kterého se tkáň v jednom směru zužuje a v druhém směru (kolmém na směr první) se prodlužuje  
laterální – postranní, boční  
lumen – průsvit, otvor (zde otvor v centrální oblasti neurální trubice)  
mediální – nacházející se ve střední rovině těla  
mezenchym – tkáň volně se pohybujících buněk s velkým množstvím mimobuněčné hmoty  
paraxiální – nacházející se podél osy hlava-ocas  
pleziomorfie – znak sdílený dvěma a více skupinami organismů, který se vyskytoval i u jejich společného předka  
posteriorní – zadní, blíže k ocasu  
primordium – útvar, ze kterého se formuje pozdější hotová struktura  
synapomorfie – znak společný alespoň dvěma příbuzným skupinám organismů, který se nevyskytoval u jejich společných předků  
ventrální – břišní

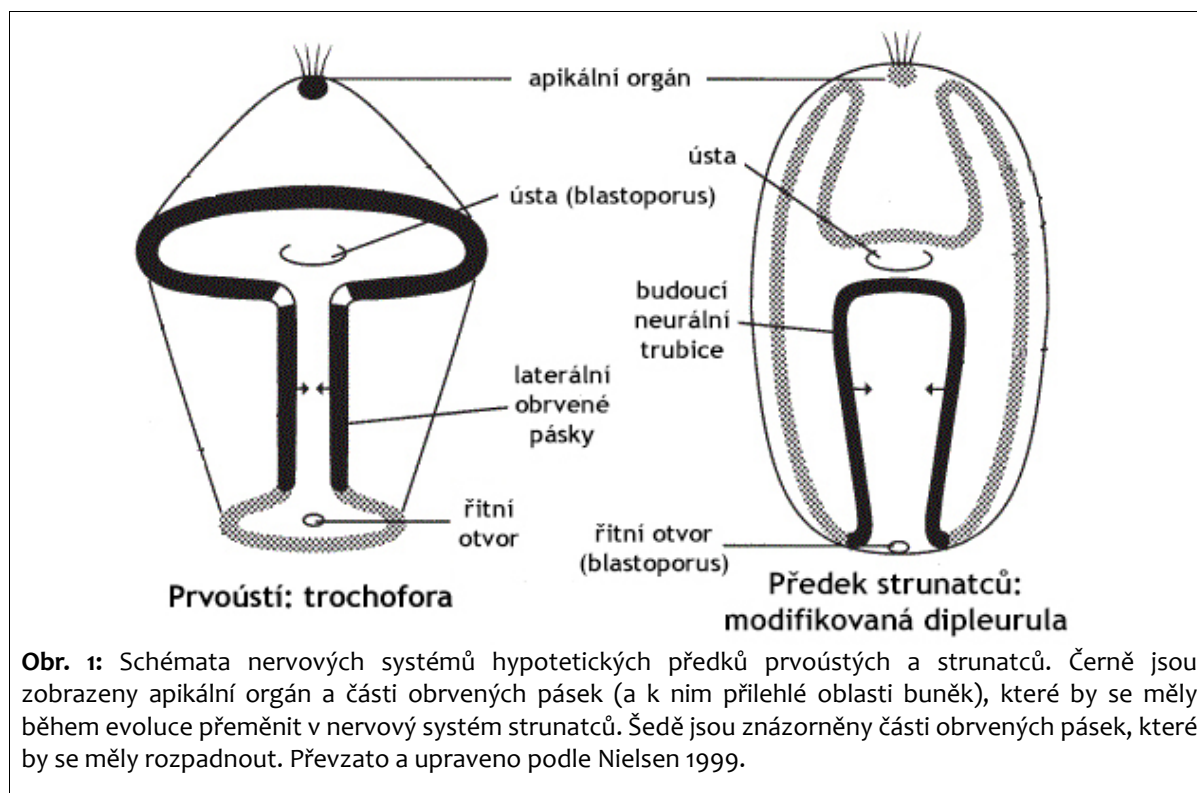


# 1. Teoretický úvod

## 1.1. Souvislost mezi nervovou soustavou strunatců a larvami skupiny *Ambulacraria*

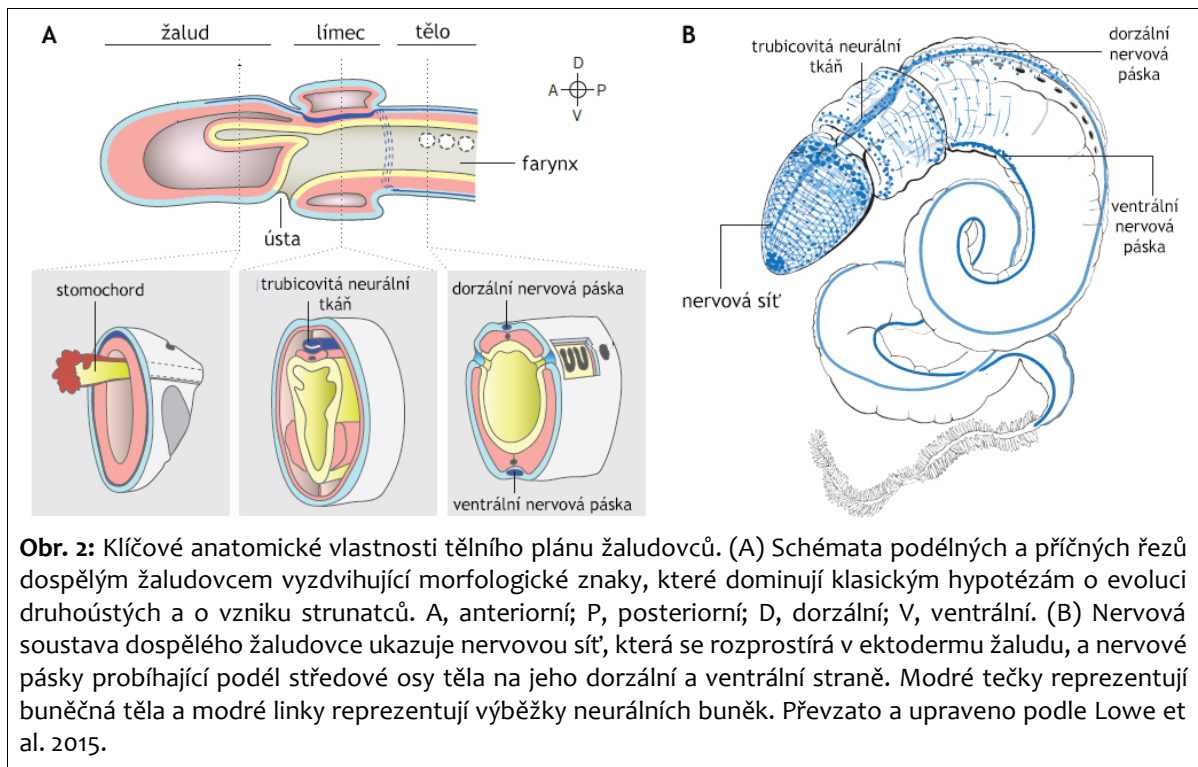
V linii druhoústých se kromě strunatců nachází i další rozličné organismy, které jsou různou mírou považovány za přechodné články mezi prvoústými a již zmíněnou linií. Během evolučního vývoje strunatců nabyla tato linie několik významných apomorfii - kromě jiného vznikla neurální trubice a chorda nebo také došlo k dorzoventrální inverzi tělní osy. Posledně zmíněný fakt popsali již Geoffroy-St. Hilaire (shrnutí kupř. (Gee 2007) a nedávné molekulární studie tuto hypotézu skutečně podpořily (Lowe et al. 2006).

Skupina *Ambulacraria* zahrnující ostnokožce a polostrunatce patří spolu se strunatci do skupiny druhoústých, ačkoliv jsou tyto dvě skupiny od sebe morfologicky i molekulárně vzdálené. Pro ně je typická ambulakrární larva charakterizovaná obrvenými pásky, jež zajišťují pohyb larvy a příjem potravy. Nervový systém je u těchto larev rozdělen do dvou částí: apikální ganglion nacházející se pod obrveným apikálním orgánem a nervové buňky vedoucí pod celou délkou obrvených pásek. Na počátku 20. století byla Garstangem formulována teorie, že už společný předek všech druhoústých měl larvu - dipleurulu a strunatci vznikli z této larvy pedomorfózou. Ústřední myšlenka této teorie tkvěla v představě, že neurální trubice strunatců vznikla dorzální migrací a fúzí laterálních obrvených pásek dipleurulové larvy a nervů nacházejících se pod nimi (**Obr. 1**) (shrnutí v Nielsen 1999). Tato teorie ale vzala za své se zjištěním, že kromě neuronů v nejanteriornější části těla žaludovců se žádné další larvální neurony nepodílí na utváření nervové soustavy dospělců (Miyamoto et al. 2010; Kaul-Strehlow et al. 2015). Dospělí ostnokožci mají příliš odvozený radiální tělní plán, a tak vymizeli z výzkumů snažících se ozřejmit podobu společného předka všech druhoústých. Mimoto nervová tkáň u ostnokožců během vývoje zcela postrádá expresi *Hox* genů, což je vnímáno jako důkaz pro odlišný původ nervové soustavy u ostnokožců a strunatců (Arenas-Mena et al. 2000). Oproti tomu polostrunatci a to především žaludovci jsou díky své stavbě centrem jedné z nejzkoumanějších hypotéz o vzniku obratlovců, ve které centrální nervový systém hraje hlavní roli.



## 1.2. Stavba nervové soustavy žaludovců

Žaludovci jsou mořští červovití živočichové charakterizovaní třídičným tělem rozděleným na žalud, límec a tělo. Nervová soustava žaludovců se v každém ze tří částí těla nachází v jiném uspořádání. V žaludu je zřejmá síť nervových buněk (plexus), v límci dochází ke svinování nervové tkáně do trubice, což nápadně připomíná neurulaci u obratlovců, a v těle se nachází dvě vzájemně propojované pásy - dorzální a ventrální (**Obr. 2**) (Lowe et al. 2015). Imaginární předek obratlovců inspirovaný tělním plánem žaludovce by se v pravého obratlovce mohl vyvinout, pokud by u něj došlo k převrácení dorzoventrální osy. Tím by se ventrální páska dostala do pozice neurální trubice u obratlovců, anteriorní plexus a trubice v oblasti límce by pak teoreticky mohly dát vzniknout mozku. Původní ústa podle této teorie zanikají a jsou nahrazena novými na ventrální straně těla. Inverze by také přemístila zbytnělé ventrální mezenterium žaludovců (pygochord) do pozice obratlovčí chordy (**Holland, 2015**).



### 1.2.1. Homologie stomochordu u žaludovců a chordy u obratlovců

S chordou bývá také často homologizován stomochord (Miyamoto and Wada 2013), podle kterého dostala skupina Hemichordata své označení. Stomochord embryonálně vzniká jako anteriorní výchlipka trávicí trubice (Sato et al. 2014), ale funkčně sdílí některé vlastnosti s chordou u obratlovců. U obratlovců je chorda zdrojem morfogenů, mezi které patří také *Sonic hedgehog* (*Shh*). U žaludovců je ve stomochordu exprimovaný homolog morfogenu *Shh* nazývaný *hedgehog* (*hh*), který je ale také produkován v okolním endodermu. Jiné genové exprese se mezi chordou a stomochordem liší, což hovoří proti homologii obou struktur (Sato et al. 2014). Stejně jako *Shh* uvolňovaný z chordy zajišťuje zanořování neurální ploténky a následný vznik neurální trubice u obratlovců, tak jeho homolog *hh* u žaludovců zabezpečuje svinování neurální tkáň v oblasti límce (Miyamoto and Wada 2013). Způsob, kterým se zanořuje neurální tkáň v límci žaludovců skutečně velmi nápadně připomíná neurulaci u obratlovců. Vzniklá trubice sice u některých žaludovců postrádá centrální lumen, ale proces vzniku je zachován u všech druhů (Kaul and Stach 2010).

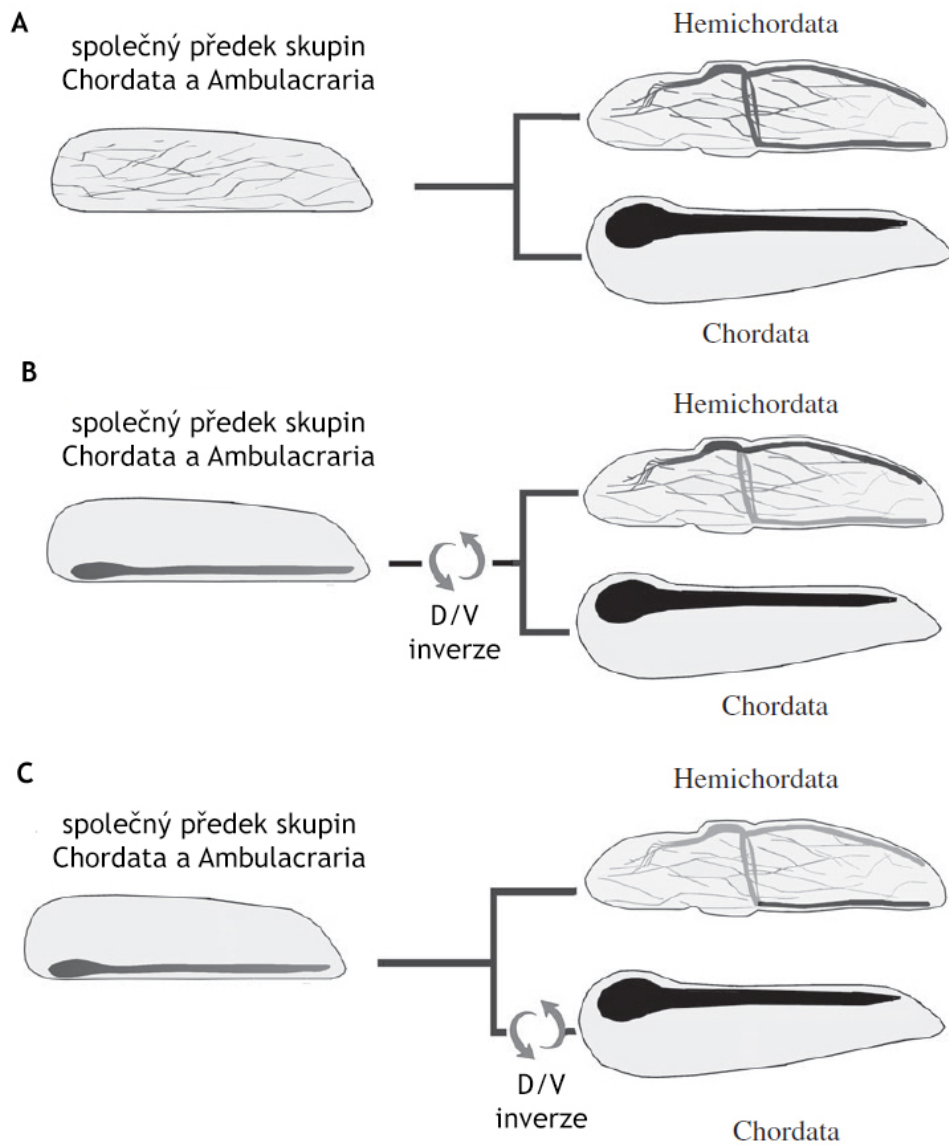
Pro vysvětlení rozporů s homologií mezi chordou a stomochordem lze navrhnout dva evoluční scénáře. V prvním scénáři předpokládáme přítomnost

společného předka druhoústých, v němž existovaly dvě struktury podobné chordě/stomochordu exprimující *hh*. Jedna ležela dorzálně a druhá ventrálně podél centrální osy endodermu. U polostrunatců byla zachována dorzální část, zatímco u strunatců byla tkáň exprimující *hh* zachována ventrálně (následně došlo k inverzi tělního plánu). Periferní nervový systém nacházející se ventrálně u kopinatce (Kaltenbach et al. 2009) a pláštěnců (Pasini et al. 2006) může být pleziomorfií homologickou k dorzální nervové pásce u žaludovců. Druhý scénář pak naznačuje, že u společného předka druhoústých byla v anteriorním endodermu ustanovena interakce mezi *hh* a nervovou tkání, která byla aktivovaná na dorzální straně embrya obratlovců. V tomto případě by stomochord a notochord sdílely pouze genetický regulační aparát pro funkci hydrostatického skeletu a indukčního místa pro nervovou tkáň (Miyamoto et al. 2013).

### **1.2.2. Evoluční vztahy mezi nervovou soustavou žaludovců a obratlovců**

Názory, které se vyjadřují ke vztahu nervové soustavy u žaludovců a obratlovců, zmiňují tři různé scénáře vzniku obou nervových soustav. Buď mezi těmito nervovými soustavami není žádná spojitost, obě vznikly nezávisle na sobě, a společný předek obou skupin měl tedy nervovou soustavu ve stavu nervové sítě. Druhou možností je, že neurální trubice u obratlovců odpovídá neurální trubici v límci žaludovců. Poslední možnost mluví o odvození neurální trubice obratlovců od dorzální nebo ventrální pásky u žaludovců (**Obr. 3**) (Holland 2015).

Pro první variantu, která předpokládá nezávislý vývoj obou nervových soustav mluví nedávná studie (Martín-Durán et al. 2018). Podle ní vznikla kondenzovaná neurální páska několikrát nezávisle na sobě (členovci, kroužkovci nebo strunatci). U skupin, které takovou pásku postrádají (jako třeba právě žaludovci), ji tedy nemůžeme dobře nalézt a homologizovat prostě proto, že ji tato skupina postrádá stejně jako ji postrádali její předci.



**Obr. 3:** Tři schémata evoluce nervové soustavy u strunatců a polostrunatců. A) Společný předek skupin *Chordata* a *Ambulacraria* měl nervovou síť. Neurální trubice u strunatců a nervové pásky u polostrunatců se vyvinuly nezávisle na sobě. B) Společný předek skupin *Chordata* a *Ambulacraria* měl ventrální nervovou pásku. Dorzoventrální inverze proběhla ještě u společného předka zmíněných skupin. Neurální trubici u strunatců je tedy homologická dorzální nervová páska u polostrunatců. C) Společný předek skupin *Chordata* a *Ambulacraria* měl ventrální nervovou pásku. Dorzoventrální inverze proběhla na bázi strunatců. Neurální trubici strunatců je tedy homologická ventrální nervová páska u polostrunatců. Převzato a upraveno podle Holland 2015.

### 1.3. Strunatci a jejich trubicovitá nervová soustava

Sesterskou skupinou k polostrunatcům jsou strunatci (*Chordata*), kam patří ze žijících živočichů bezlebeční (*Cephalochordata*), pláštěnci (*Tunicata*) a obratlovci (*Vertebrata*). Novinkou v této skupině je vznik chordy, která se odděluje od dorzální strany prvostřeva (od tzv. střechy archenteronu) a také vznik neurální trubice, která leží nad chordou a alespoň během embryogeneze se táhne podél celé délky těla stejně jako chorda.

Analýzy založené na jaderných genech prověřily v posledních letech mnoho fylogenetických vztahů ustanovených na základě mitochondriálních genů a/nebo na základě morfologie, např. (Delsuc et al. 2006; Philippe et al. 2005). Zejména rychle se vyvíjející skupiny (např. pláštěnci) se na základě těchto analýz posunuly z bazálních pozic výše a jejich poměrně jednoduchá stavba těla je nyní interpretovaná jako druhotná redukce (Delsuc et al. 2006). Do role nejbazálnějšího žijícího strunatce se tak dostal kopínatec, který byl kvůli své značné morfologické podobnosti s obratlovcem odjakživa považován za jejich nejbližšího příbuzného.

#### 1.3.1. Neurulace u kopínatce

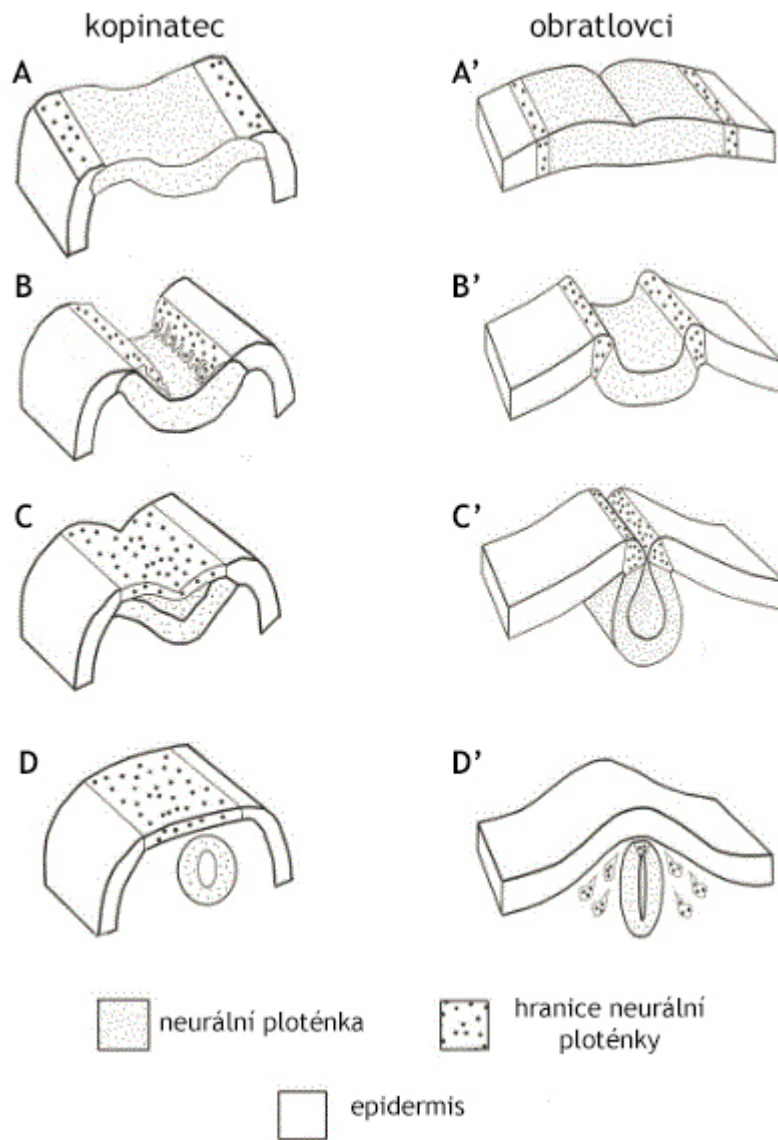
Kopínatec se od obratlovců oddělil před 550 miliony lety a obě skupiny se od té doby vyvíjejí relativně pomalu. Genom kopínatce se vyvíjí dokonce pomaleji než nejpomaleji se vyvíjející obratlovec chiméra *Callorhinchus milii* (Yue et al. 2014). Obratlovcem podstoupili v raných fázích své evoluční historie dvě kola celogenomové duplikace (2R) (Dehal and Boore 2005), která neproběhla u kopínatce (Putnam et al. 2008). Pomalá evoluce i jednodušší genom tak dělá z kopínatce dobrý zdroj informací pro studium historie samotných obratlovců. Kopínatec také v mnohém připomíná kambrijské fosilie jakou je třeba *Haikouella*, která ale má oproti kopínatci párové oči a větší mozek, a tak je vnímána coby sesterská skupina obratlovců (Morris and Caron 2014). Je ale nezbytné připomenout, že se u moderního kopínatce mohly během milionů let samostatně evoluce vyvinout nové vlastnosti nebo některé původní vlastnosti došly změny. Dostupné informace ale naznačují, že tyto změny byly spíše drobné (Holland 2015).

Co se týče centrální nervové soustavy u kopínatce, nacházíme zde dorzální nervovou trubici, která je drobně rozšířená v anteriorní části ve strukturu nazývanou mozkový váček (Gaisler and Zima 2007). Teorie zabývající se vznikem obratlovčího

mozku zvažují buď variantu, ve které mozek obratlovců vzniká jako novotvar, a nebo odvozuji mozek od ancestrální nervové trubice podobné té, jež nalezneme u kopinatce. Kopinatec postrádá populaci buněk neurální lišty, která se u obratlovců zcela oddělí od okrajů neurální ploténky a migruje do těla, kde dává vzniknout rozličným tkáním (Holland and Holland 2001).

Na počátku neurulace začne posteriorní epidermis kopinatce migrovat anteriorně přes blastoporus, čímž se vytváří neurenterický kanál spojující budoucí lumen neurální trubice s dutinou trávicí soustavy. Tato posteriorní epidermis se na dorzální straně embrya spojuje s epidermis oddělenou od krajů neurální ploténky a migrujícím ve vrstvách mediálně. Dohromady celý proces vytváří kontinuální vrstvu dorzálního ektodermu, která kryje budoucí neuroektoderm (Gaisler and Zima 2007).

Pro snadnější a přitom stále realistické pochopení uzavírání neurální trubice u kopinatce lze z popisu vynechat migraci posteriorní epidermis přes blastoporus. U kopinatce, stejně jako u vyšších obratlovců, probíhá neurulace ohýbáním neurální ploténky (**Obr. 4A, A'-D, D'**). Rozdíl mezi kopinatcem a obratlovcem je v tom, že u prvně zmíněného se epidermis na krajích neurální ploténky oddělí od neurálního epitelu (**Obr. 4B**). Epidermis začne následně migrovat v kompaktních vrstvách (**Obr. 4C**). Ty po setkání uprostřed neurální ploténky splývají (**Obr. 4D**) (Holland et al. 1996). Buňky nacházející se na okrajích této vrstvy vytvářejí lamellipodia (výběžky buněk často využívané při migraci) a exprimují gen *Distalless* (Holland et al. 1996), který je mimo jiné exprimován v buňkách neurální lišty u obratlovců. Až po tomto splynutí se začne ohýbat neurální ploténka, která dá následně vzniknout neurální trubici. Pro srovnání, u obratlovců se neurální ploténka nejprve ohýbá a od epidermis se odděluje až po vytvoření neurální trubice (**Obr. 4A'-D'**).



**Obr. 4:** Neurulace u kopínatec a obratlovců. (A, A') Ve stádiu pozdní gastruly mají jak kopínatec tak obratlovci neurální ploténku s rozlišitelnými okraji, které ji dělí od epidermis. (B, B') Ve stádiu rané neuruly se u kopínatec epidermis oddělí od okraje neurální ploténky a migruje přes ní. Oproti tomu u obratlovců zůstává epidermis připojená k neurální ploténce po celou dobu jejího svinování. (C, C') Ve stádiu pozdní neuruly u kopínatec splývají okraje epidermis nad středovou osou neurální ploténky. Neurální ploténka se začíná svinovat pod spojenou epidermis. U obratlovců je ve srovnatelném stádiu již svinutá neurální trubice. (D, D') U kopínatec i obratlovců se neurální ploténka zcela svine a oddělí od epidermis. Převzato a upraveno podle Holland, 2015.

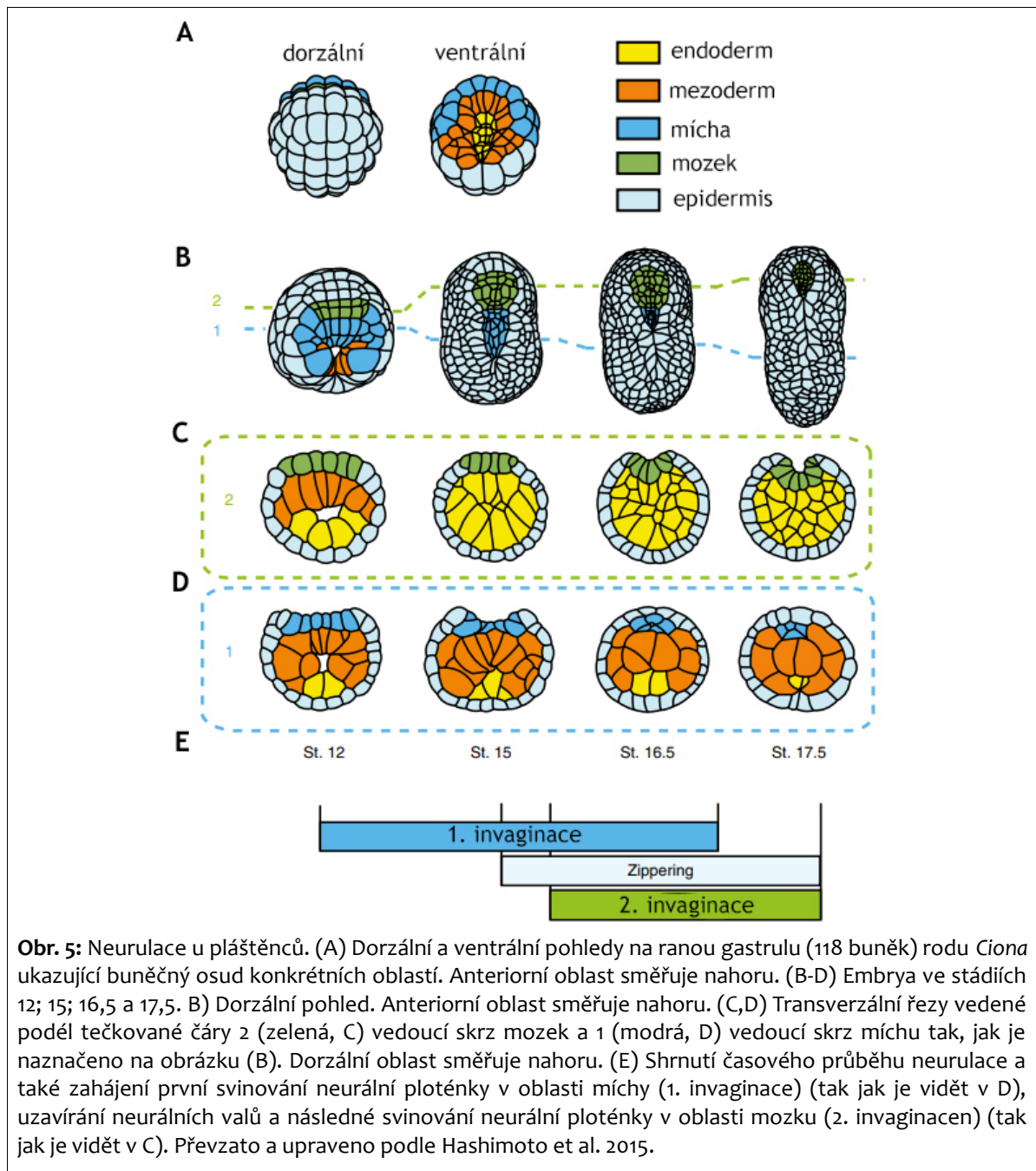


### 1.3.2. Neurulace u pláštěnců

Sesterskou skupinou obratlovců jsou pláštěnci. Vlastností, která charakterizuje pláštěnce, je schopnost syntetizovat celulozu u pláštěnců nazývanou tunicin. Z ní si pak vytváří pro ně typický plášť, díky kterému získali jak své české tak i latinské jméno (*Tunicata*). Schopnost takové syntézy je běžně spojena s bakteriemi nebo rostlinami, u živočichů je to ale vlastnost naprosto unikátní (Gilbert 2014; Gaisler and Zima 2007).

Genomy pláštěnců jsou velmi redukováné, což se odráží i ve ztrátě několika vývojových genů a larvy mají jen několik buněk. Všechny tyto vlastnosti vytvářejí situaci, kdy je téměř nemožné rekonstruovat společného předka s jejich sesterskou skupinou – s obratlovcí (Delsuc et al. 2006). S rekonstrukcí společného předka by byla získána jasnější představa o tom, kolik typicky obratlovčích vlastností existovalo ještě před celogenomovou duplikací (2R), která proběhla v rane fázi vývoje obratlovců (Dehal et al. 2005). Zdá se, že pláštěnci sekundárně ztratily tělní segmentaci, coelom a ledviny, ale obratlovcům se podobají vlastnostmi jako jsou těsné mezibuněčné spoje, proto-neurální lišta, pruhované svaly srdce aj. (Holland 2015).

Navzdory jejich značné odlišnosti jsou pláštěnci dobrým modelem pro studium neurulace. Podobně jako u obratlovců i u pláštěnců se neurální trubice vytváří invaginací neurálního epitelu, následovanou jeho prodlužováním a zužováním a proces je ukončen splynutím neurálních valů (Nicol and Meinertzhagen 1988a; Nicol and Meinertzhagen 1988b). Na počátku neurulace pláštěnců je jejich neurální ploténka tvořená jednou vrstvou buněk. Posteriovní neurální ploténka dá vzniknout podélnému neurálnímu provazci zatímco anteriorní část neurální ploténky vytvoří sensorický váček. Nejprve se zanořuje posteriovní ploténka ve směru odzadu dopředu (Nicol and Meinertzhagen 1988b), jejíž neurální valy se následně uzavírají ve stejném směru způsobem, který připomíná zapínání zipu. Oproti tomu anteriorní neurální ploténka se zanořuje tak, že vytváří mělký důlek, který se následně symetricky uzavře a vytvoří tak sférickou cystu (**Obr. 5**).



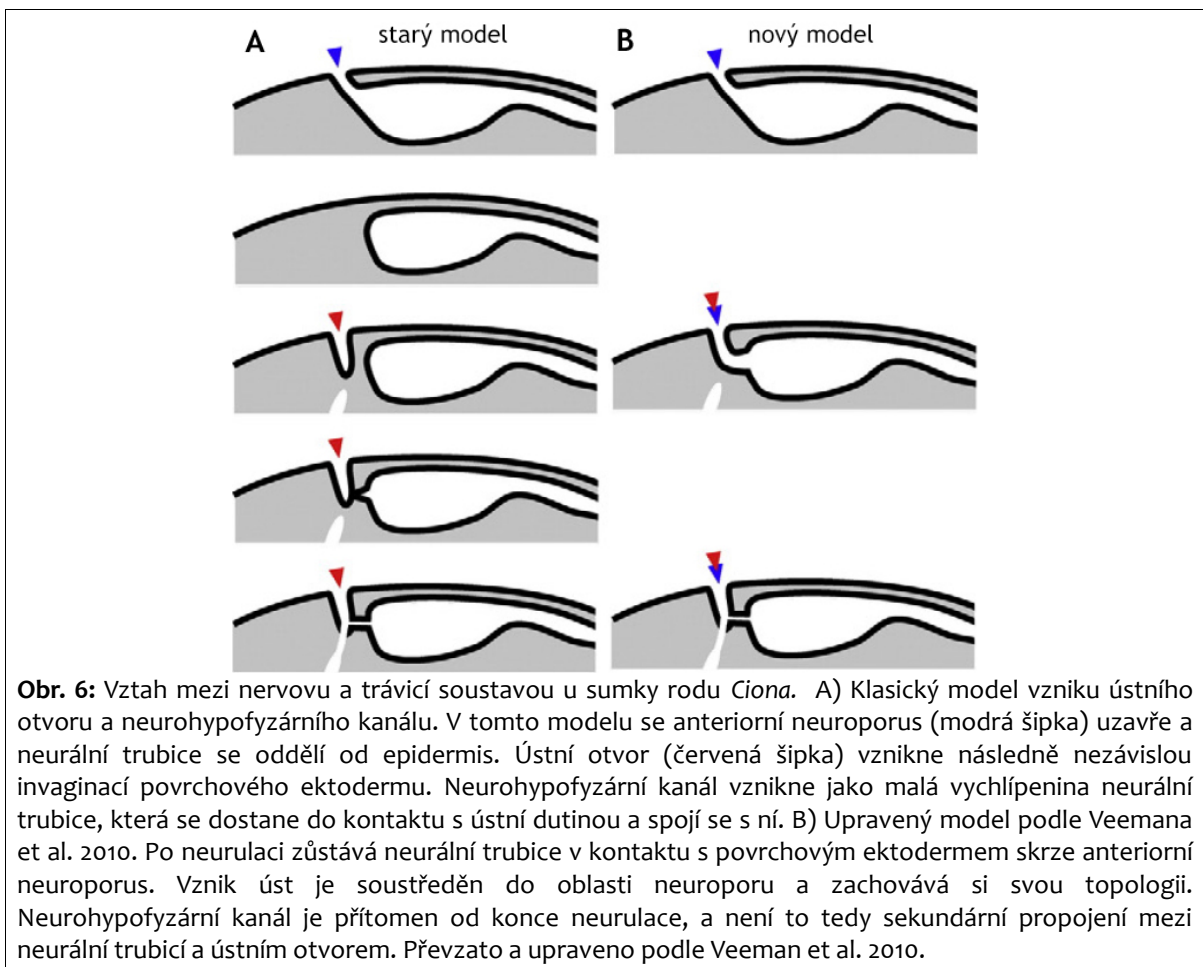
**Obr. 5:** Neurulace u pláštěnců. (A) Dorzální a ventrální pohledy na ranou gastrulu (118 buněk) rodu *Ciona* ukazující buněčný osud konkrétních oblastí. Anteriorní oblast směřuje nahoru. (B-D) Embrya ve stádiích 12; 15; 16,5 a 17,5. B) Dorzální pohled. Anteriorní oblast směřuje nahoru. (C,D) Transverzální řezy vedené podél tečkované čáry 2 (zelená, C) vedoucí skrz mozek a 1 (modrá, D) vedoucí skrz míchu tak, jak je naznačeno na obrázku (B). Dorzální oblast směřuje nahoru. (E) Shrnutí časového průběhu neurulace a také zahájení první svinování neurální ploténky v oblasti míchy (1. invaginace) (tak jak je vidět v D), uzavírání neurálních valů a následné svinování neurální ploténky v oblasti mozku (2. invaginace) (tak jak je vidět v C). Převzato a upraveno podle Hashimoto et al. 2015.

### 1.3.2.1. Propojení nervové a trávicí soustavy u pláštěnců

Vývoj nervové soustavy je obecně vnímaný jako nezávislý na vývoji trávicí soustavy, kdy obě struktury procházejí vlastní vývojovou cestou. U sumky rodu *Ciona* se nicméně ukazuje, že ústa jsou odvozena přímo z anteriorního neuroporu (Veeman et al. 2010). Existuje zde totiž úzký kanál spojující během larválního vývoje lumen neurální trubice s ústním primordiem. Dříve byl přijímán názor, že tento tzv. neurohypofyzální kanál se během embryogeneze sekundárně připojí ke vzniklé ústní dutině. Později se ale

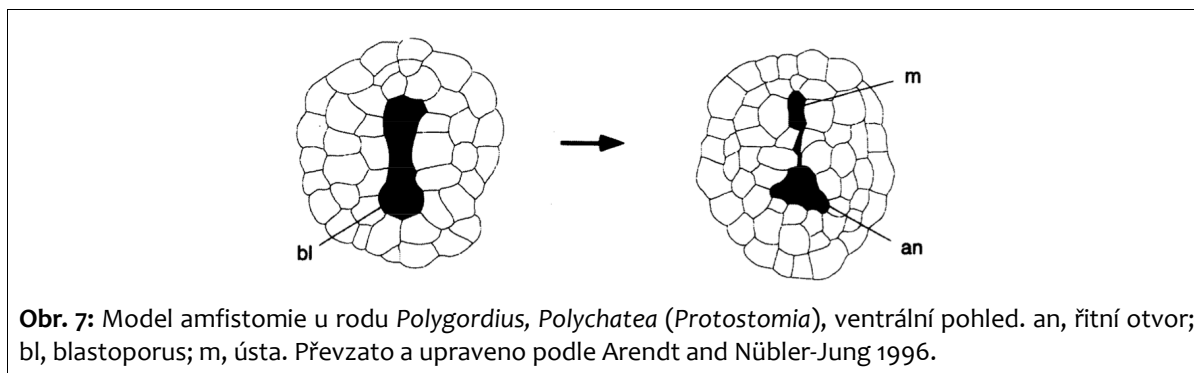
ukázalo, že neurohypofyzální kanál je přítomný od konce neurulace a zdá se, že je to nejanteriornější část neurální trubice (**Obr. 6**) (Veeman et al. 2010).

Evolučně blízké skupiny pláštěnců jsou kopinatci (*Cephalochordata*) a obratlovci (*Vertebrata*). Vznik jejich úst by mohl vnést světlo do evolučního původu této struktury a jejího vztahu k neurální trubici. Bohužel vznik úst u kopinatce tuto problematiku příliš nevyjasní. Jeho ústa vznikají během larválního vývoje mezi strunatci naprosto unikátním způsobem a to na levé straně z coelomového váčku odvozeného z prvního somitu a následně migrují ventrálně. Jejich vznik je podle nedávných studií apomorfií kopinatců a zcela evolučně nezávislý na vzniku úst ostatních strunatců (Kaji et al. 2016).



Oproti tomu obratlovci vykazují jistou podobnost vzniku úst s odpovídajícím procesem u pláštěnců. U žáby rodu *Xenopus* sice nevznikají ústa přímo z anteriorního neuroporu, ale přesto vznikají z anteriorního okraje neurální ploténky na její pomyslné středové ose, tedy topologicky ve stejném místě jako u pláštěnců (Veeman et al. 2010).

Představa, kdy se neurální trubice postupně uzavírá tak, že v poslední fázi zůstávají otevřené pouze anteriorní a posteriorní neuropous, nás dovádí k překvapivému připodobnění neurulace ke gastrulaci skrz tzv. šterbinový blastoporus někdy nazývaný model amfistomie (**Obr. 7**) (Arendt and Nübler-Jung 1997). Podobnost ale nalezneme také s již zamítnutou Delsmanovou teorií, že neurulace reprezentuje duplikaci nebo rekapitulaci gastrulace (Delsman 1922, ex. Veeman et al. 2010).

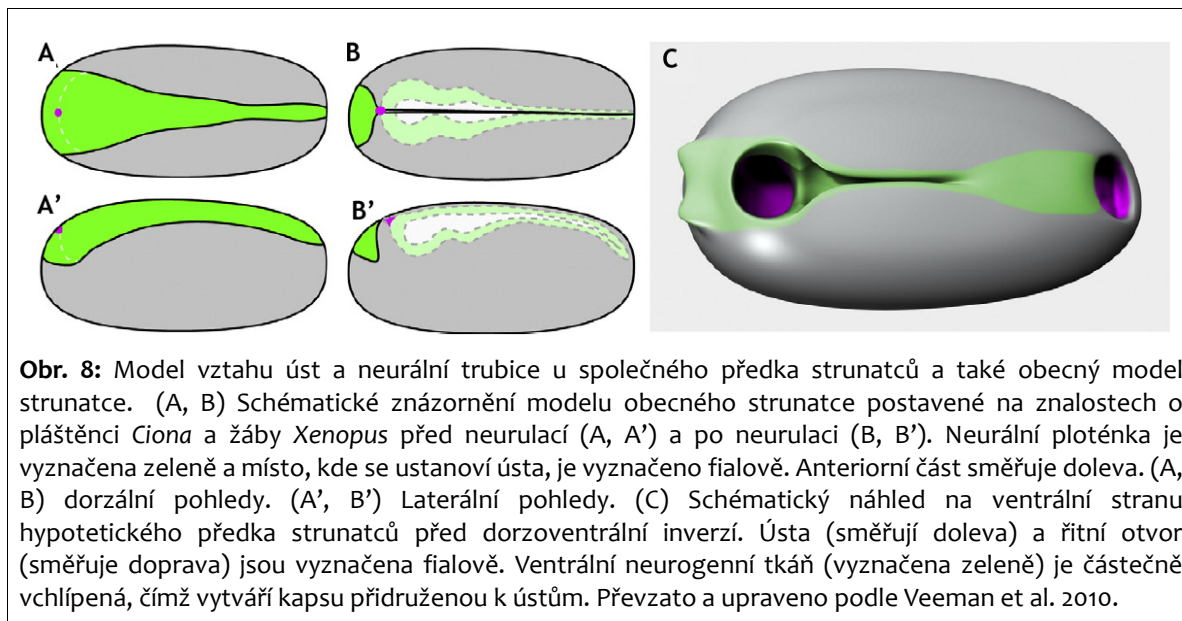


### 1.3.2.2. Evoluční vztahy mezi nervovou a trávicí soustavou u pláštěnců

Ačkoliv u zástupce pláštěnců vznikají ústa na anteriorní hranici neurální ploténky, není zřejmé, zda je tato situace ancestrální nebo zda svinování neurální ploténky posteriorně za ústy je až sekundární událost následující po vzniku úst. Můžeme se domnívat, že neurální trubice vzniklá až sekundárně byla ve své expanzi omezena anteriorně umístěnými ústy. Vznik úst přímo z anteriorního neuroporu tak může být výsledkem celkového zjednodušení a miniaturizace tělního plánu pláštěnců (Veeman et al. 2010).

Alternativně lze uvažovat, že vznik úst a neurální trubice je od počátku úzce propojen. Domnělý předek strunatců by tak měl ústa na ventrální straně, kde se také nacházel nervový systém v podobě nervové pásky na povrchu těla (nikoliv internalizovaná neurální trubice). Malý žlábek nebo váček v rámci nervové pásky posteriorně od úst mohl sloužit jako sensorický orgán (**Obr. 8**). Tento žlábek se mohl následně posteriorně prodlužovat a nabývat na významu coby centrální nervový systém. Nově nabytý význam by pak převládl nad původní sensorickou funkcí. U dnešních strunatců vzniká neurální trubice během vývoje dříve než ústa. Společný předek strunatců by tak musel během své evoluce prodělat časový posun v embryogenezi, neboť jeho výchozí stav popsany výše předpokládá nejprve vznik úst a až na ně napojený vznik neurální trubice. Hypotéza, že neurální trubice vznikla coby

senzorický orgán propojený s ústy je vysoce spekulativní. Na druhou stranu ale nabízí vývojově uskutečnitelné přechodné stavy a také selekční tlak, který poháněl protahování neurální trubice dále posteriorně (Veeman et al. 2010).



## 1.4. Obratlovci coby organismy s nejvíce prozkoumanými procesy neurulace

Korunovou skupinou strunatců jsou obratlovci (*Vertebrata*). Ačkoliv patří spolu s kopinatci a pláštěnci mezi strunatce, pro lepší přehled byli v rámci této práce vyděleni do samostatné kapitoly. Jak již bylo zmíněno, obratlovci prošli dvěma koly celogenomové duplikace (2R) (Dehal and Boore 2005). Mnoho takto vzniklých paralogů (kopií genů) bylo během evoluce ztraceno, zatímco ty geny, které se podílely na embryogenezi a ty, které kódovaly signální proteiny, byly ponechány (Putnam et al. 2008). Nově vzniklé geny mohly sloužit jako určitá volná "sada nástrojů", jež byla využita kromě jiného také pro vznik velkého a komplexního mozku, který je pro obratlovce typický (Holland et al. 1994).

Neurulace u obratlovců je studována na několika úrovních. Ať už se jedná o morfogenezi tkání, např. (Schoenwolf and Smith 1990), buněčnou úroveň, např. (Pyrgaki et al. 2010) nebo subbuněčné procesy podílející se na vzniku neurální trubice, např. (Nishimura et al. 2012), vše vytváří dohromady komplexní představu o tomto složitém procesu. Velký vědecký zájem o pochopení vzniku neurální trubice u

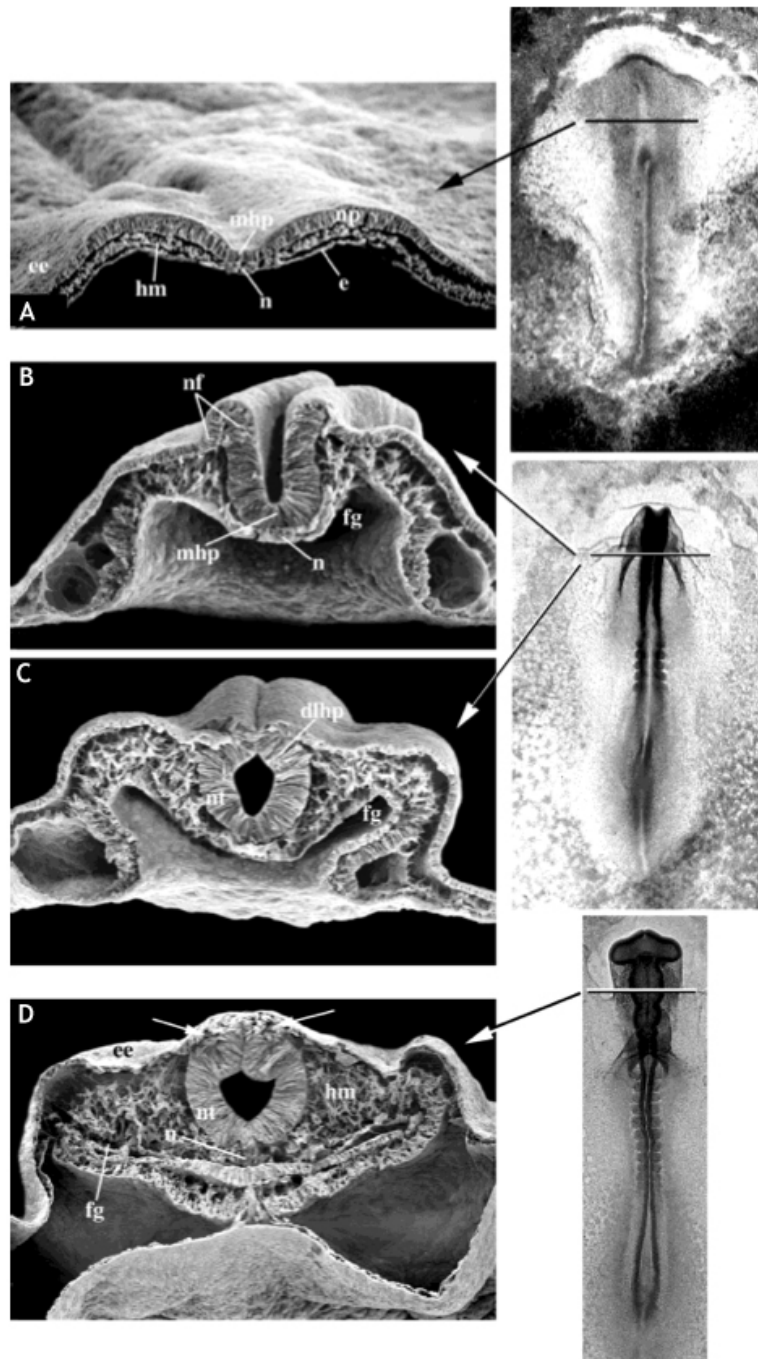
obratlovců je také podepřen snahou předcházet defektům neurální trubice, které jsou druhou nejčastější vadou u novorozenců dětí (Wallingford et al. 2013).

### 1.4.1. Neurulace u obratlovců

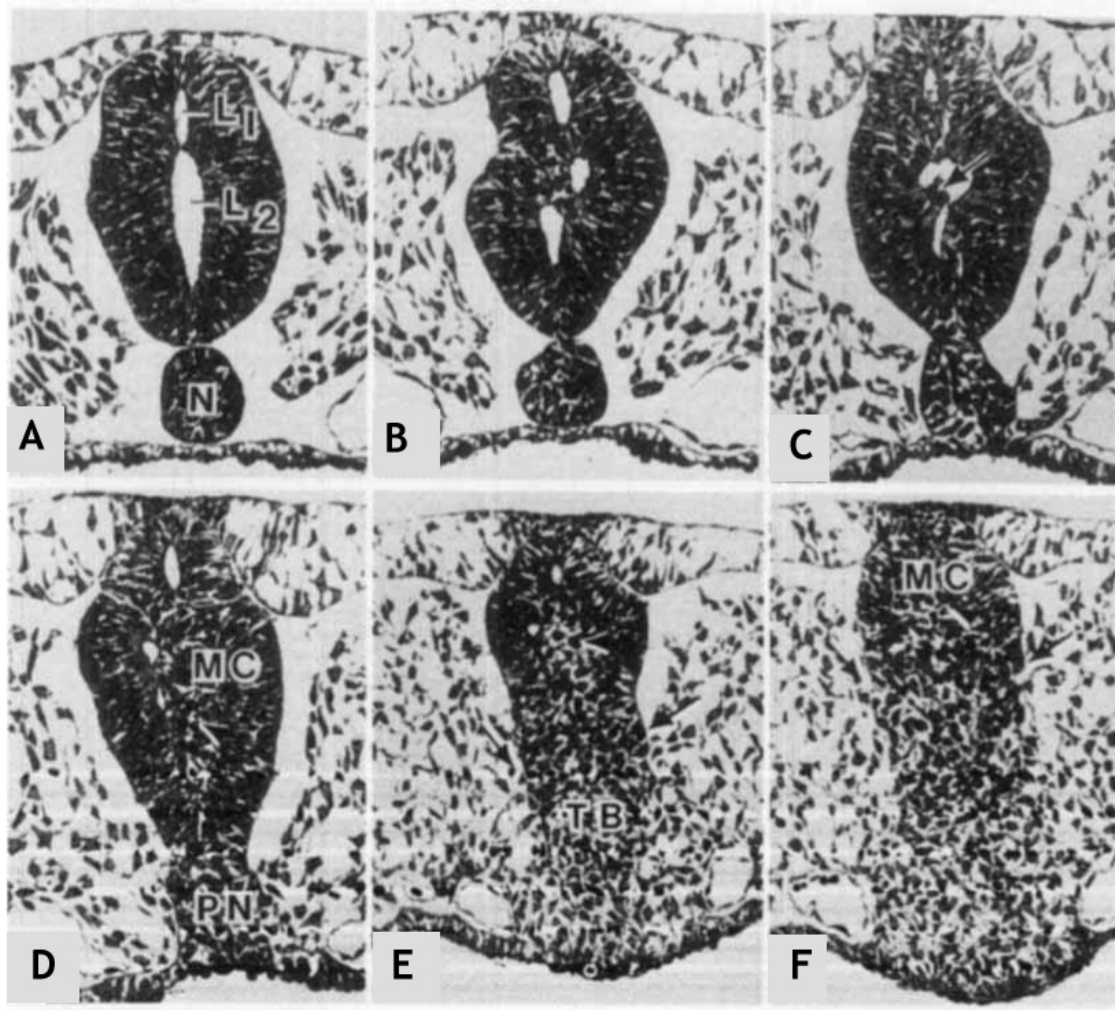
Nejvíce byla neurulace studována u modelových organismů jako je myš (*Mus musculus*), kuře (*Gallus gallus*), žába drápatka vodní (*Xenopus laevis*) a ryba dánío pruhované (*Danio rerio*). Je třeba mít na paměti, že zmínění živočichové nemusejí být reprezentativními zástupci svých skupin, a tak je nutná obezřetnost při vyslovování obecných pravidel o neurulaci na základě znalostí týkajících se neurulací těchto modelových organismů.

Ačkoliv je vznik neurální trubice předmětem mnoha studií, stále zůstává nejasné, do jaké míry je tento proces napříč obratlovci konzervovaný. Při studiu vzniku jiných orgánů, které mají během vývoje také tvar duté trubice (např. ledviny či plíce) se ukázalo, že vznikají různými morfogenetickými procesy navzdory tomu, že jejich výsledný tvar je velmi podobný (Hogan and Kolodziej 2002). Dalo by se namítnout, že “trubice je trubice” bez ohledu na to, jakým způsobem vzniká, ale právě proces vzniku je možná ještě důležitější než výsledný tvar především pro ty, kteří se zajímají o evoluční mechanismy.

Neurální trubice u obratlovců vzniká dvěma rozdílnými způsoby. V anteriorní části probíhá tzv. primární neurulace. Při ní nejprve dojde ke vzniku neurální ploténky způsobeném ztluštěním neurálního epitelu, která se vzápětí začne ohýbat, při čemž se v její centrální části vytváří neurální žlábk laterálně lemovaný neurálními valy. Ty se k sobě přibližují až do splynutí jejich dorzální části, což vyústí ve vznik uzavřené neurální trubice (**Obr. 9**) (kupř: Colas et al. 2001). V posteriorní části vzniká neurální trubice procesem tzv. sekundární neurulace, při kterém mezenchymatické buňky kondenzují v pevný shluk buněk, který druhotně nabývá epiteliálního charakteru. Současně probíhá proces tzv. kavitace, kdy v centrální části pevného shluku buněk vznikají malé průzory (kavity), které následně splývají v jedno centrální lumen (**Obr. 10**) (Schoenwolf 1979; Schoenwolf and Delongo 1980; Nakao and Ishizawa 1984).



**Obr. 9:** Neurulace u kuřete. Orientace celých embryí (3 snímky napravo) a frontální řezy (A-D) embryem v různých stádiích primární neurulace u kuřete přibližně v úrovni budoucího středního mozku (úrovně řezu jsou vyznačeny linkami na snímcích celých embryí); (B, C) jsou přejaty ze stejné úrovně u dvou různých embryí. Jedno (B) je ve stádiu neurálního žlábků, druhé (C) je ve stádiu vznikající neurální trubice. (A) Otevřená neurální ploténka se začíná ohýbat podél mediální osy. (B) Stádium neurálního žlábků. (C) Vznikající neurální trubice. Stojí za všimnutí, že neurální valy jsou již v kontaktu, ale ještě nesplynuly. (D) Stádium definitivní neurální trubice. Stojí za všimnutí, že neurální valy splynuly a vytvořily dorzální část neurální trubice, populaci buněk neurální lišty (šipky) a epidermis dorzálně nad neurální trubicí. Dlhp, dorzolaterální místa ohybu; e, endoderm; ee, epidermis; fg, pharynx; hm, hlavový mezoderm; mhp, střední místo ohybu; n, chorda; nf, neurální val; np, neurální ploténka. Převzato a upraveno podle Colas and Schoenwolf 2001.



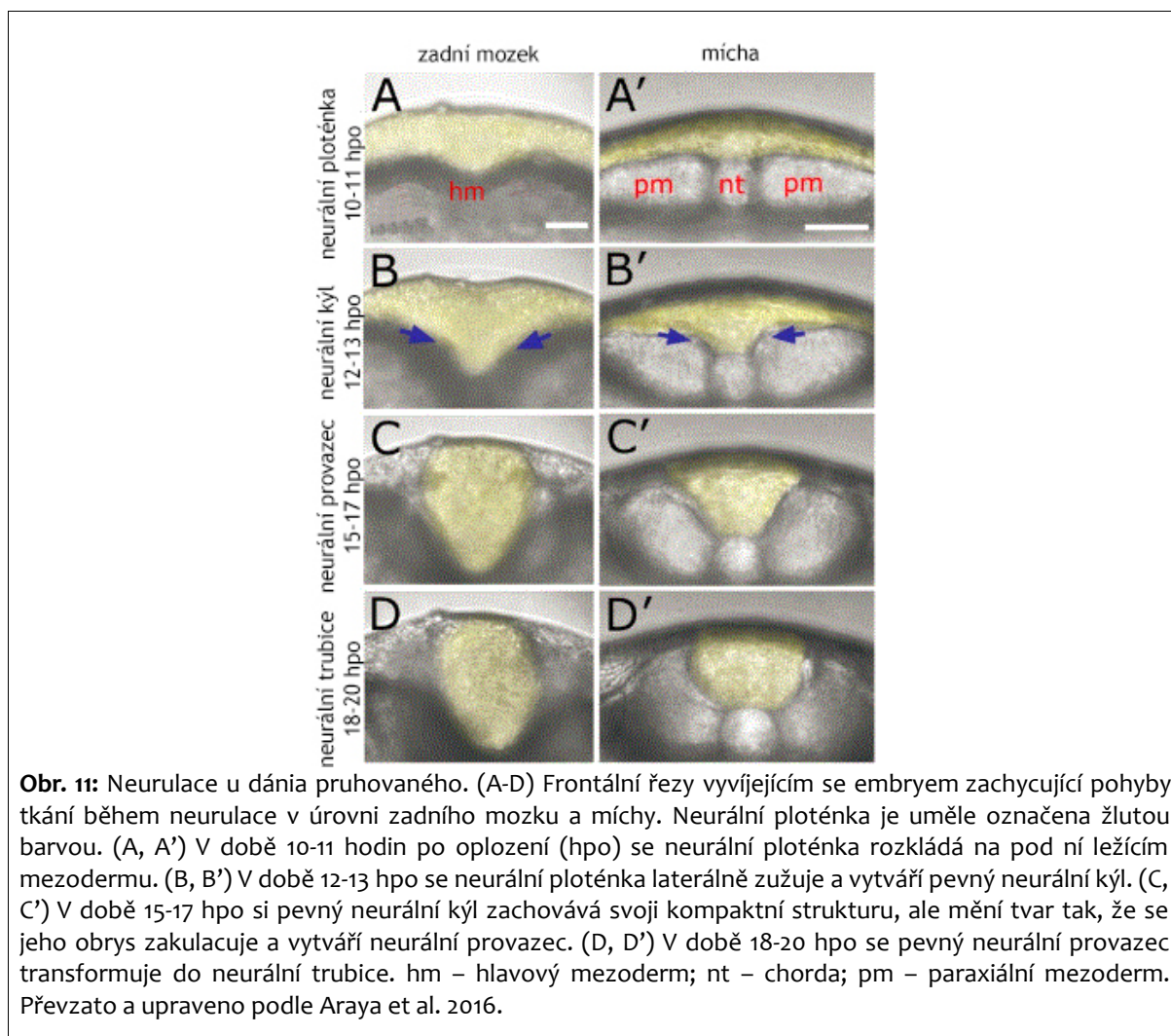
**Obr. 10:** Přechod mezi primární a sekundární neurulací u kuřete. (A-F) Lumen umístěné nejvíce dorzálně je napojeno na lumen v anteriorní oblasti, které vzniklo primární neurulací. Zbývající lumen vznikla procesem kavitace. Snímek (F) je kaudálně od přechodné zóny. Šipka na snímku C označuje skupinu centrálních buněk, které se pravděpodobně vmezeřují mezi periferní buňky během toho, jak lumen vzájemně splývají. Hroty šipek na snímcích (D-F) označují volně nahloučené centrální buňky ocasního pupenu. Šipky na obrácích (E) a (F) označují laterální hranice ocasního pupenu. L1 – dorzální lumen; L2 – ventrální lumen; MC – kondenzovaný shluk neurálních buněk; N – chorda; PN – shluk buněk, který dá vzniknout chordě; TB – ocasní pupen. Převzato a upraveno podle Schoenwolf and Delongo 1980.

### 1.4.2. Neurulace u kostnatých ryb

Výše popsané způsoby neurulace můžeme s drobnými odchylkami nalézt u naprosté většiny skupin obratlovců, konkrétně u myši (Shum and Copp 1996; Schoenwolf 1984), kuřete (Colas and Schoenwolf 2001; Schoenwolf and Delongo 1980), žáby (Davidson and Keller 1999), žraloka (Adachi and Kuratani 2012) i mihule (Nakao and Ishizawa 1984). U kostnatých ryb, kterých je početně mezi obratlovci převaha, ale nacházíme něco zcela odlišného. Zde sice také dochází ke ztlustění neurální epitelu za vzniku neurální ploténky, nejsou zde ale patrné žádné neurální valy a místo neurální trubice s



lumen uprostřed se vytváří kompaktní neurální kýl, ve kterém se lumen ustanoví až dodatečně (**Obr. 11**) (Schmitz et al. 1993; Miyayama and Fujimoto 1977).



**Obr. 11:** Neurulace u dánia pruhovaného. (A-D) Frontální řezy vyvíjejícím se embryem zachycující pohyby tkání během neurulace v úrovni zadního mozku a mícha. Neurální ploténka je uměle označena žlutou barvou. (A, A') V době 10-11 hodin po oplození (hpo) se neurální ploténka rozkládá na pod ní ležícím mezodermu. (B, B') V době 12-13 hpo se neurální ploténka laterálně zužuje a vytváří pevný neurální kýl. (C, C') V době 15-17 hpo si pevný neurální kýl zachovává svoji kompaktní strukturu, ale mění tvar tak, že se jeho obrys zakulacuje a vytváří neurální provazec. (D, D') V době 18-20 hpo se pevný neurální provazec transformuje do neurální trubice. hm – hlavový mezoderm; nt – chorda; pm – paraxiální mezoderm. Převzato a upraveno podle Araya et al. 2016.

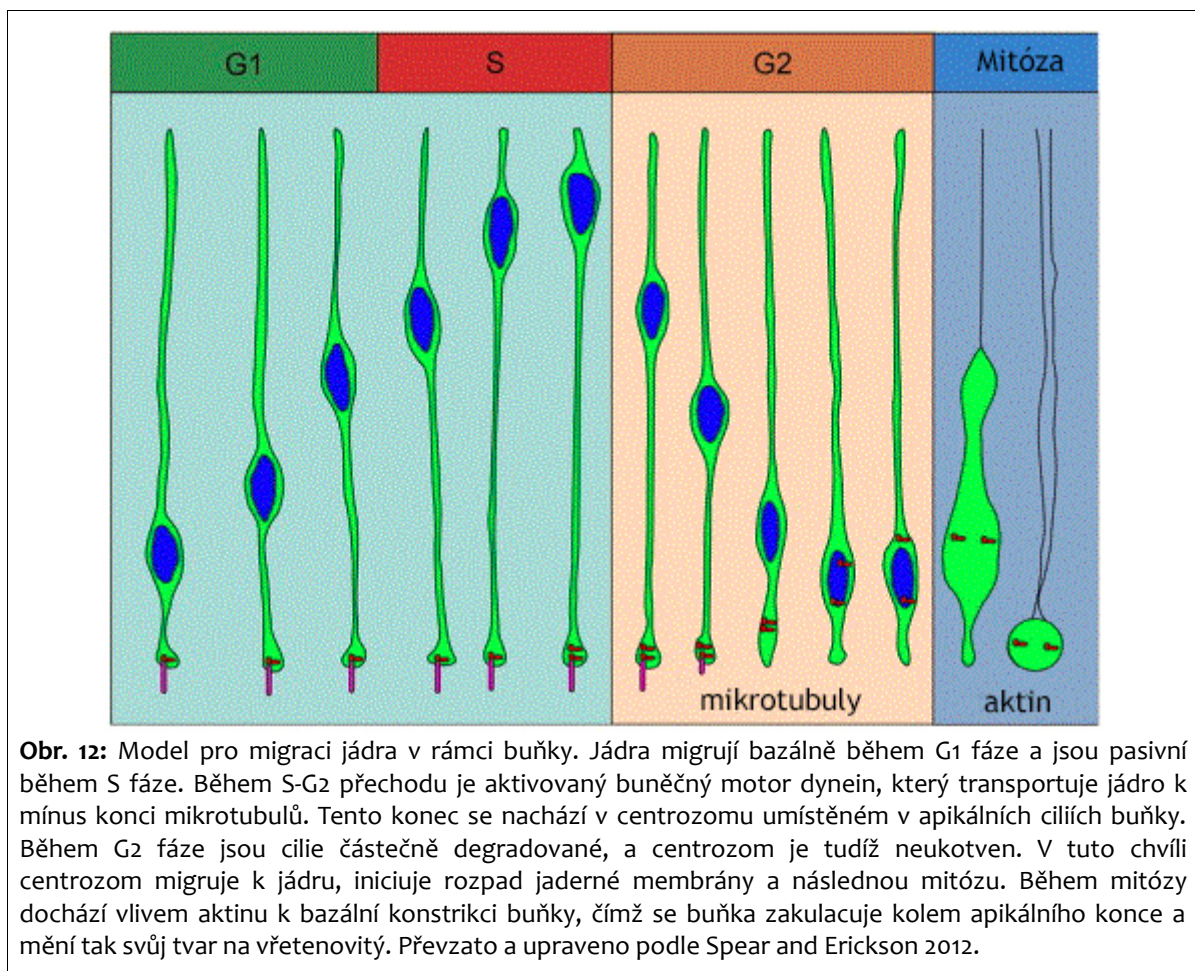
### 1.4.3. Primární neurulace

Rozdíly v rané embryogenezi obratlovců jsou přítomné již od počátku. U drápatky je po ukončení gastrulace v posteriorní oblasti raných embryí patrný blastoporus, od něhož se anteriorně ustanovuje otevřená neurální ploténka. Horní ret blastoporu slouží během gastrulace jako indukční centrum (např. Gilbert 2014). Buňky migrující přes něj z povrchu dovnitř embrya dávají v první řadě vzniknout chordě, která se ustanovuje v anterioposteriorní orientaci těsně pod dorzálním ektodermem. Chorda pak pomocí signálu *shh* indukuje vznik neurální ploténky, která je u drápatky dvouvrstevná (Davidson et al. 1999).

U kuřete a myši probíhá gastrulace skrze tzv. primitivní proužek, který stejně jako blastoporus dává signál buňkám migrujícím skrz něj do ventrálních oblastí. Z nich

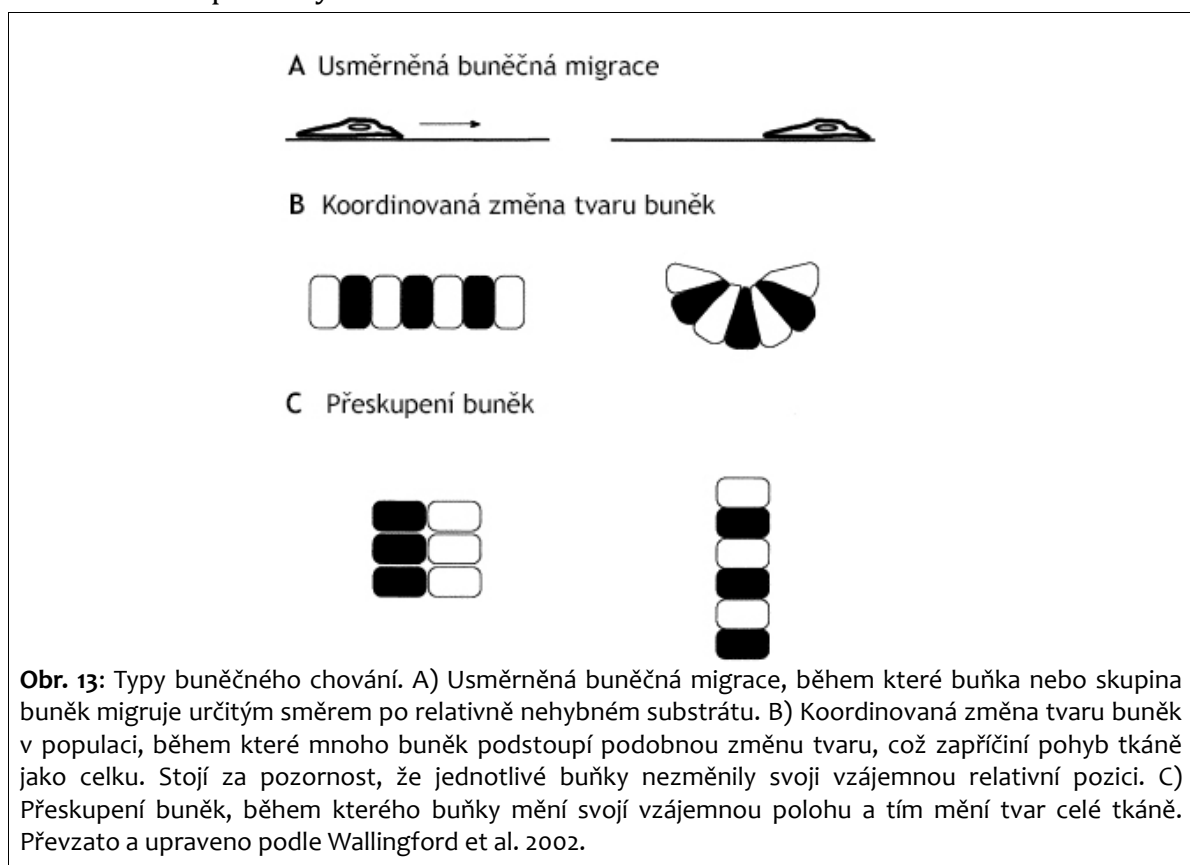
se potom kromě jiného vytváří chorda, která taktéž pomocí *shh* signálu definuje oblast neurální ploténky. U kuřete však vzniká neurální ploténka pouze jednovrstevná (Colas et al. 2001).

Neurální ploténka vzniká z buněk epitelu, které se apikobazálně prodlouží. Za prodloužení jsou zodpovědné mikrotubuly, které se řadí podél apikobazální osy buněk, což bylo dokázáno jak u kuřete (Schoenwolf and Powers 1987), tak u obojživelníků (Burnside 1971). S mikrotubuly je také úzce spjatá migrace buněčných jader podél apikobazálních os buněk (**Obr. 12**). Ta se na tkáňové úrovni projevuje jako tzv. pseudostratifikovaný epitel a značí dělení buněk v rámci epitelu. V neurální ploténce jádra migrují apikálně v G2 fázi, kde se připravují k dělení. Mitóza a cytokineze probíhá ve chvíli, kdy je jádro v nejapikálnější oblasti. Po dělení během G1 fáze jádro putuje k bazálnímu pólu, kde podstupuje S fázi, tedy syntézu DNA. Pokud byl inhibován vznik mikrotubulů, jádra nemigrovala a buňky se nedělily (což souvisí také s inhibicí mitotického vřetenka) (Spear and Erickson 2012).



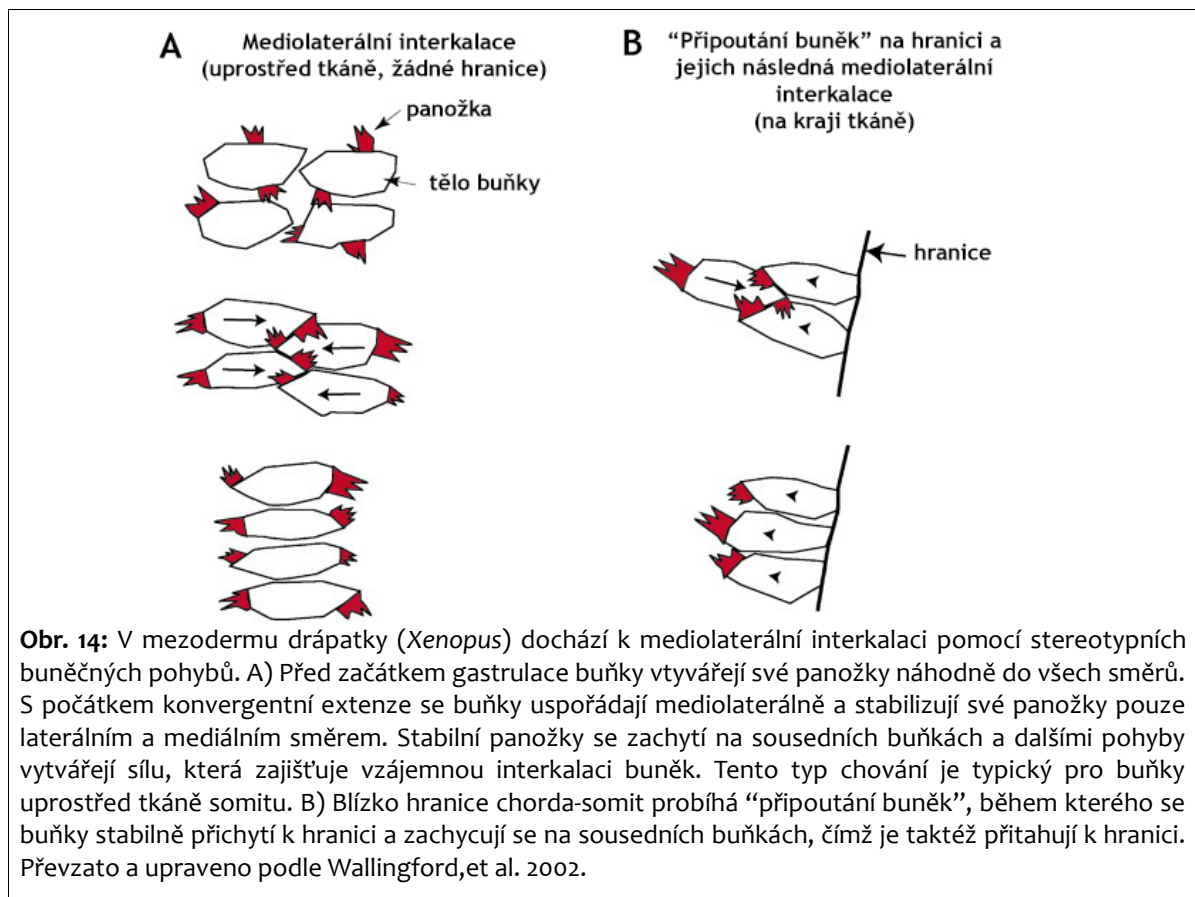
Po ustanovení neurální ploténky následuje proces konvergentní extenze. Jedná se o proces, během kterého se tkáň v jednom směru prodlužuje a v druhém směru (kolmém na ten první) se tkáň zužuje. V kontextu neurulace se neurální ploténka anteroposteriorně prodlužuje za současného laterálního zužování (Wallingford et al. 2002). Konvergentní extenze však není spojena pouze s morfogenezí neurální ploténky, ale patří mezi několik základních morfogenetických procesů, které formují vznikající embryo. Kvůli tomu bude tento proces popsán šířeji.

Při uvažování nad typy buněčného chování lze říci, že jedním extrémem jsou buňky migrující jednotlivě nebo ve skupinách na relativně nehybném substrátu, jakým je např. bazální lamina nebo okolní tkáň. Migrující buňky neurální lišty ilustrují tento příklad. Na druhé straně existuje taková morfogeneze tkáně, kdy nedochází k téměř žádnému přesunu buněk jako takových, ale dochází pouze ke změně tvarů buněk. Pod tím si lze představit apikálně zúžené buňky vytvářející místa ohybu neurální ploténky při uzavírání neurální trubice. Závěrem existuje stav mezi těmito dvěma extrémy, kdy jednotlivé buňky v rámci tkáně mění svoji polohu vůči svým sousedům, čímž se mění tvar celé populace jako celku (**Obr. 13**). Příkladem je právě konvergentní extenze buněk neurální ploténky.



Mechanismy konvergentní extenze byly studovány jak na neurální ploténce tak na paraxiálním mezodermu drápatky. Ukázalo se, že buňky vytvářejí mediolaterálním směrem panožky, které jim umožňují pevně se zachytit na sousedních buňkách (Wallingford et al. 2000). Rozdíl mezi neurálními a mezodermálními buňkami byl v monopolárním respektive bipolárním směru vytváření panožek (Keller et al. 2000). Díky vzájemné trakci buněk není pro konvergentní extenzi potřeba žádný pevný substrát, který by buňky při svých přesunech používaly.

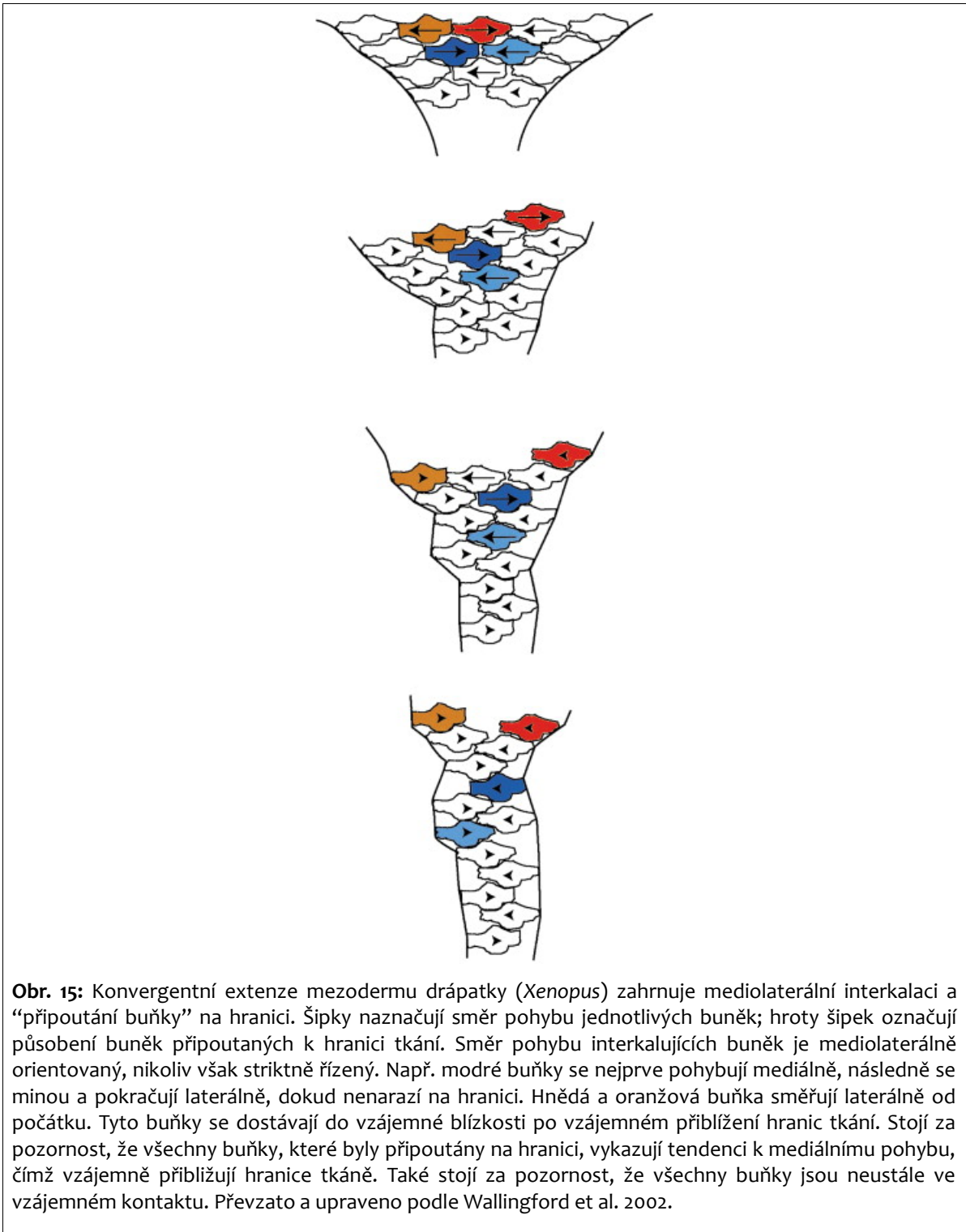
Nejjednodušším vysvětlením, proč se buňky přesouvají při konvergentní extenzi mediálním směrem, je takové, že buňky následují nějaký atraktant, který je vylučován podél mediální osy. V případě mezodermu u drápatky tomu tak však není. Ukazuje se, že se buňky pohybují se stejnou pravděpodobností mediálním i laterálním směrem. Důvod, proč i přesto dochází ke konvergentní extenzi tkáně, tkví v tzv. "připoutání buněk" na hranici tkáně (Obr. 14) (Shih and Keller 1992).



V případě mezodermu šlo o hranici somit-chorda. Pokud se buňky s panožkami na obou pólech dostaly do kontaktu s chordou, ukotvily se k ní a panožky zůstaly aktivní pouze na té straně buňky, která nebyla ukotvená. Tím, že ukotvené buňky stále vykazovaly aktivitu na jedné své straně, byly schopné se zachytit na sousedních buňkách a tím je přitáhnout k chordě, čímž docházelo k usměrněné konvergentní extenzi tkáně (Shih et al. 1992). Lze tedy říci, že dokud bude v tkáni přítomná mediální nebo laterální hranice, dokud bude fungovat mechanismus "připoutání buněk" na hranici a pokud se budou buňky přesouvat pomocí zachycování na ostatních buňkách svými panožkami, pak bude docházet ke konvergentní extenzi (**Obr. 15**) (Keller et al. 2000).

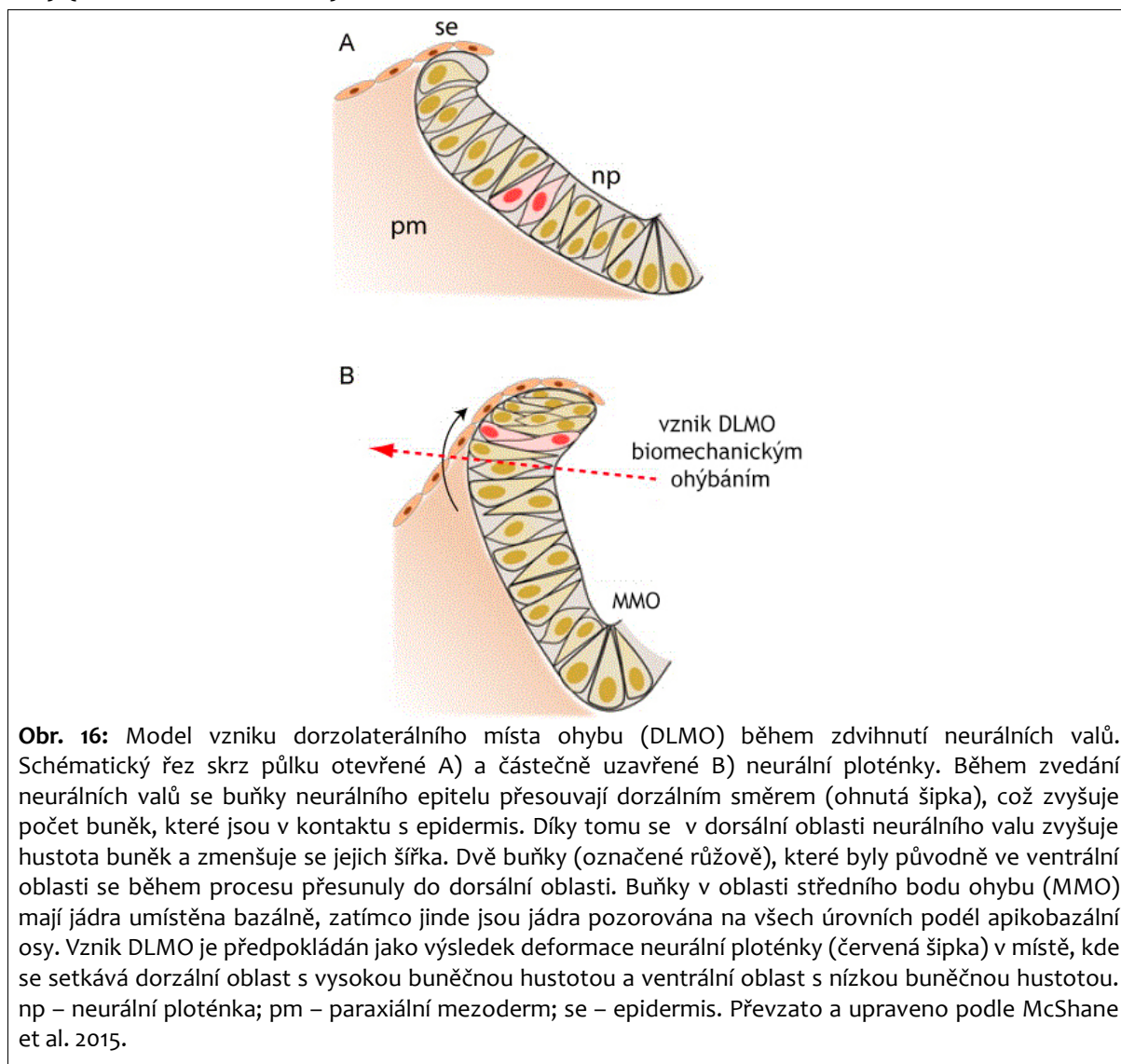
Po ustanovení neurální ploténky a konvergentní extenzi dochází k ohýbání neurální ploténky za vzniku neurálních valů. Obecně se předpokládá, že za ohýbání neurální ploténky je především zodpovědné zúžení apikálních konců buněk (tzv. apikální konstriktce), které je způsobeno aktinem nahromaděným v těchto buněčných oblastech (Lee et al. 2007). Často se neurální ploténka ohýbá ve třech místech: středním bodě ohybu, který se nachází dorzálně nad chordou, a dvou dorzolaterálních místech ohybu nacházejících se v oblasti zdvižených neurálních valů. Nicméně pokusy na myších ukázaly, že při rozložení aktinu za pomoci cytochalasinu, se objeví problémy s uzavíráním neurální trubice pouze v anteriorní oblasti. Posteriovní oblast neurální trubice se uzavírá bez problémů a vytváří se jak střední místo ohybu tak dorzolaterální místa ohybu (Ybot-Gonzalez and Copp 1999). V ohýbání neurální ploténky tedy musí být zahrnuty i jiné mechanismy.

Klíčovým faktorem pro vznik středního místa ohybu se zdá být pozice buněčných jader v buňkách nacházejících se nad chordou. U kuřete a myši je střední místo ohybu tvořeno zejména buňkami klínového tvaru s bazálně lokalizovanými jádry. Naproti tomu ty oblasti neurální ploténky, které se neohýbají, jsou tvořeny směsí buněk různých tvarů (Schoenwolf and Franks 1984; Smith and Schoenwolf 1997).



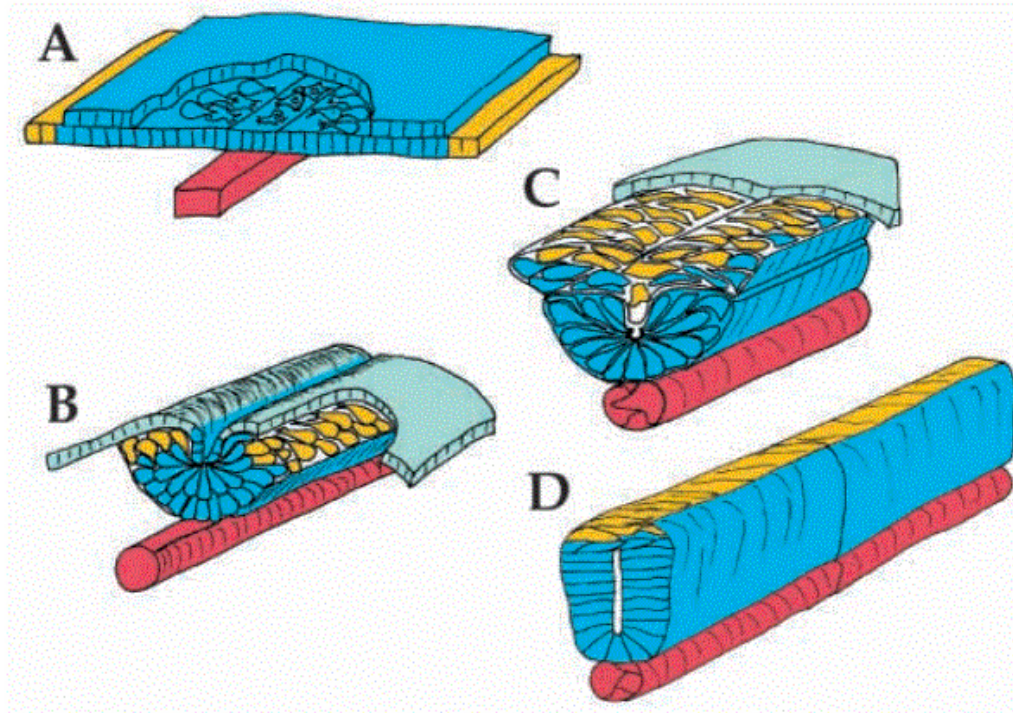
Během vzniku dorzolaterálních míst ohybu v posteriorní oblasti myši se nápadně zvětšuje počet i hustota buněk ve vrcholcích neurálních valů, zatímco šířka jednotlivých buněk se zmenšuje. Zdá se, že zde dochází dokonce i k translokaci buněk z mediální oblasti neurální ploténky do laterálních oblastí. Dorzolaterální místa ohybu tak mohou v této oblasti vznikat díky biomechanickým pohybům. Dorzální část

neurálního valu s větší hustotou buněk se ohýbá relativně ke své ventrální části (**Obr. 16**) (McShane et al. 2015).



**Obr. 16:** Model vzniku dorzolaterálního místa ohybu (DLMO) během zdvihnutí neurálních valů. Schématický řez skrz půlku otevřené A) a částečně uzavřené B) neurální ploténky. Během zvedání neurálních valů se buňky neurálního epitelu přesouvají dorzálním směrem (ohnutá šipka), což zvyšuje počet buněk, které jsou v kontaktu s epidermis. Díky tomu se v dorsální oblasti neurálního valu zvyšuje hustota buněk a zmenšuje se jejich šířka. Dvě buňky (označené růžově), které byly původně ve ventrální oblasti se během procesu přesunuly do dorsální oblasti. Buňky v oblasti středního bodu ohybu (MMO) mají jádra umístěna bazálně, zatímco jinde jsou jádra pozorována na všech úrovních podél apikobazální osy. Vznik DLMO je předpokládán jako výsledek deformace neurální ploténky (červená šipka) v místě, kde se setkává dorzální oblast s vysokou buněčnou hustotou a ventrální oblast s nízkou buněčnou hustotou. np – neurální ploténka; pm – paraxiální mezoderma; se – epidermis. Převzato a upraveno podle McShane et al. 2015.

I podle dalších zdrojů není neurální epitel během neurulace úplně rigidní struktura (Davidson et al. 1999). U drápatky, která svou neurulaci začíná s dvouvrstevnou neurální ploténkou se ukázalo, že při uzavírání neurální trubice se laterální buňky hlubší vrstvy přesouvají mediálně dvěma způsoby. Budoucí buňky neurální lišty migrují jednotlivě za současné tvorby panožek směřujících mediálně. Ostatní buňky, které se podílejí na ustanovení dorzální části neurální trubice, vytvářejí panožky mediálně i laterálně a vzájemně se mezi sebe vmezeřují, čímž vytvářejí jednovrstevný epitel (**Obr. 17**) (Davidson, et al. 1999).



**Obr. 17:** Neurulace v trupu u drápatky vodní (*Xenopus laevis*). A) Mediální migrace buněk hlubší vrstvy tvaruje neurální ploténku, dochází zde ke konvergentní extenzi. B) V průběhu neurulace dochází k apikální konstrikcí svrchní vrstvy buněk, čímž vzniká neurální žlábek. Další změna tvaru buněk v neurální ploténce, chordě a budoucích somitech vytváří neurální valy. Buňky v hlubší vrstvě, nacházející se nad chordou, se vmezeřují mezi buňky svrchní vrstvy, čímž vytváří jednovrstevný epitel. C) Po uzavření neurálních valů je dorzální část neurální trubice doutvářena mediální migrací a vzájemnou interkalací buněk. Buňky hlubší vrstvy ve ventrální oblasti NT vytvoří jednovrstevný epitel jako první. Vmezeřování a vytváření jednovrstevného epitelu pak pokračuje dál dorzálně. D) V nejdorzálnější oblasti NT se po ukončení migrace a vmezeřování ustanoví populace buněk neurální lišty. Tmavě modře – neurální ektoderm; žlutě – buňky neurální lišty; světle modře – epidermis; červeně – chorda. Převzato a upraveno podle Davidson et al. 1999.

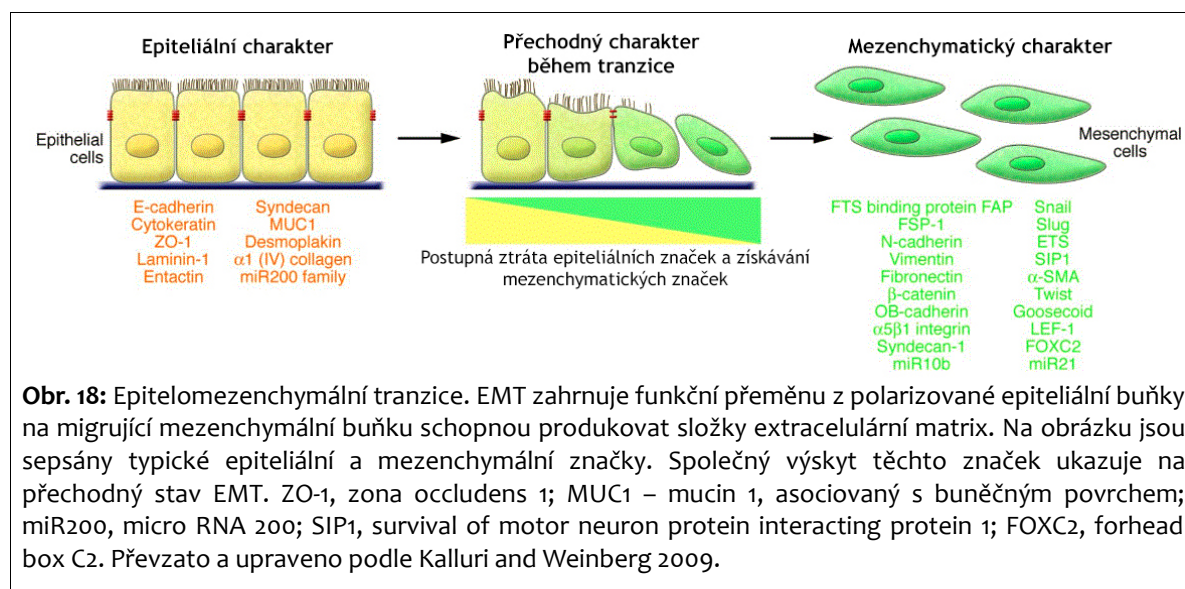
Z výše popsaného je zřejmé, že při nejmenším některé epiteliální buňky jsou schopné nabýt mezenchymatický charakter. Proces, kterým se tak děje, se nazývá epitelomezenchymální tranzice (EMT). U epiteliálních buněk je za normálních podmínek zřejmá jejich apikobazální polarizace, kdy jejich bazální část je v kontaktu s bazální laminou. Ty během EMT projdou několika biochemickými a strukturálními změnami, které jim umožní nabýt mezenchymatický charakter, což zahrnuje ztrátu polarizace, vyvázání z těsných kontaktů se sousedními buňkami a tím také zvýšenou schopnost migrace často pomocí panožek (Kalluri and Weinberg 2009).

Jednou z typicky epiteliálních značek je E-cadherin, který se nachází na cytoplazmatických membránách epiteliálních buněk, kde zajišťuje soudržnost epiteliální tkáně. Součástí E-cadherinových komplexů je také beta catenin (Kim et al.



1998). Pokud dochází k EMT, E-cadherinové komplexy se rozpadají a beta catenin se stává součástí cytoplazmy. Zde beta catenin interaguje s ostatními proteiny, což vede k jeho transportu do buněčného jádra, kde se dále podílí na EMT (Kim et al. 2002).

Vedle E-cadherinu existuje řada dalších epiteliálních značek, které se během EMT postupně ztrácí nebo jsou nahrazovány typicky mezenchymatickými vlastnostmi. Během rané embryogeneze je často pozorována EMT ale i přeměna zpět, tedy mezenchymoepiteliální tranzice (MET). Některé buňky se tak mohou nacházet v jakémsi mezistavu, kdy zároveň projevují některé epiteliální a jiné mezenchymatické vlastnosti (**Obr. 18**) (Kalluri and Weinberg 2009). Během neurulace se s tímto procesem setkáváme především během odmigrovávání buněk neurální lišty (Kerosuo and Bronner-Fraser 2012) a je předpokládána při vytváření neurální trubice v posteriorní oblasti, kde dochází k sekundární neurulaci (O'Shea 1987).

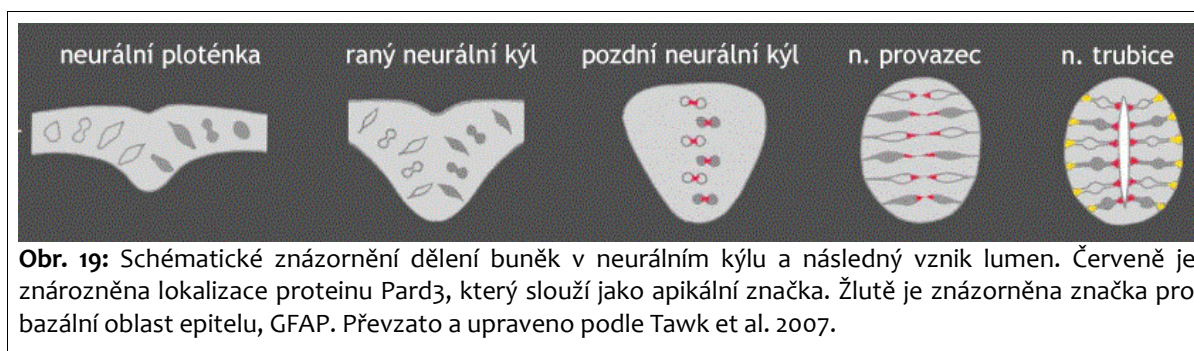


#### 1.4.4. Vznik neurálního kýlu

Odlišná neurulace u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) je střídavě přirovnávána k mezenchymatické sekundární neurulaci nebo k pozměněné primární neurulaci (Nikolopoulou et al. 2017).

Podobně jako v primární neurulaci se u dánia objevují konvergentní pohyby neurální ploténky, které ústí ve vznik neurálního kýlu (Ciruna et al. 2006). Nejedná se ale o typickou morfogenezi epitelu, neboť epiteliální charakter (tj. apikálně exprimované epiteliální markery) tkáň nabývá až ve stádiu neurálního kýlu (Geldmacher-Voss et al. 2003). Následně vzniká centrální lumen, jehož dodatečně

ustanovení je připodobňováno ke kavitaci během sekundární neurulace. Nejnovější poznatky ale ukazují, že se jedná o zcela specifický mechanismus, který je známý pouze u otvírání lumen v neurálním kýlu. Buňky jsou v neurálním kýlu uspořádány do pravého a levého sloupce. Při dělení dochází ke vzniku dceřiné buňky, která má zrcadlovou apikobazální polarizaci. To jí umožňuje přejít z jednoho sloupce do druhého, kde se vmezeří mezi ostatní buňky a připojí se zde k bazální membráně. Mateřská buňka pak zůstává na svém místě. Mezi apikálními konci obou buněk se otvírá nové lumen (**Obr. 19**) (Tawk et al. 2007).



### 1.4.5. Evoluční vztah mezi primární neurulací a neurálním kýlem

Při zohlednění příbuzenských vztahů strunatců a zejména vztahů mezi obratlovci, nám při uvažování nad procesy neurulace jasně vyvstane skutečnost, že neurulace svinováním neurální ploténky (tzv. primární neurulace) je evolučně ancestrální znak, který patrně zdědili strunatci od společného předka. Jediná skupina, která se tomuto schématu vymyká je korunová skupina paprskoploutvých ryb (*Actinopterygii*), tj. kostnaté ryby (*Teleostei*). Je tedy zřejmé, že neurulace skrz neurální kýl se musela evolučně vyvinout z ancestrálního typu neurulace svinováním. V této práci se vyjadřuji k procesům, které vedly k přechodu od ancestrálního typu neurulace k neurulaci skrze neurální kýl. Abych mohla takovou analýzu udělat, zaměřila jsem se na neurulaci u kmenových skupin paprskoploutvých ryb (*Actinopterygii*) a to konkrétně u bichira senegalského (*Polypterus senegalus*), jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) a kostlína mexického (*Atractosteus tropicus*). Tyto skupiny se postupně oddělovaly od linie vedoucí ke kostnatým rybám, a tak jejich způsoby neurulace vykazují drobné rozdíly, které dokáží zmapovat zmíněnou proměnu v procesech neurulace největší skupiny žijících obratlovců.

## 2. Materiál a metody

Pro experimenty byla použita unikátní vývojová série bichira senegalského *Polypterus senegalus*, jesetera malého *Acipenser ruthenus* a kostlína mexického *Atractosteus tropicus*. Embryonální stádia jedinců byla získána z různých zdrojů. Bichiři pocházeli z chovů Katedry zoologie Přírodovědecká fakulty UK. Jeseteři byli pravidelně získáváni z Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech díky spolupráci s Martinem Pšeničkou, PhD. a Davidem Gelou, PhD. Kostlíni byli dovezeni z Universidad Juaréz Autónoma de Tabasco v Mexiku, kde se podařilo navázat spolupráci s Leninem Arias Rodriguezem, PhD. za velkého jak vědeckého tak lidského přispění Martina Minaříka, PhD. Embrya pro tento projekt byla fixována ve stádiích od pozdní gastrulace až po zcela uzavřenou neurální trubici. Podle tabulek normálního vývoje se jedná přibližně o následující stádia: bichir 19-22 (Diedhiou and Bartsch 2009), jeseter 18-24 (Dettlaff et al. 1993) a kostlín 12-18 (Long and Ballard 2001).

### 2.1. Fixace

Způsob fixace se lišil podle toho, na co byla embrya následně využita. Pro skenovací elektronovou mikroskopii a histologické řezy byla embrya fixována v 4% roztoku paraformaldehydu (PFA). Roztok PFA může svým dlouhodobým působením vytvářet kovalentní vazby na epitopech nezbytných pro správné navázání protilátek, a tak pro barvení protilátkami byla převážně využívaná embrya fixovaná krátce v PFA a následně převedená do metanolu.

### 2.2. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Fixovaná embrya byla převedena z PFA do fixáže (2,5% glutaraldehyd v 0,1 M PBS), kde byla uchovávána na ledě a prvních šest hodin se s nimi 1x za hodinu mírně pohnulo, aby bylo dosaženo maximální infiltrace fixáže do tkání. Po fixáži byla embrya 15 minut promývána v PBS. Dalšími kroky pak byla dehydratace vzorků ve vzestupné etanolové řadě (25%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% a 100%). Embrya byla promývána 15 minut při prvním a druhém kroku, od 70% etanolu se ale doba promývání zkrátila na 10 minut, aby se zamezilo přílišnému zkrěhnutí vzorku, které by mohlo vést k porušení struktury při závěrečném sušícím kroku provedeném metodou CPD (Critical point drying) v aparatuře Bal-Tec CPD 030. Vysušené vzorky byly pomocí roztavené pryskyřice

(Tempfix kit) připevněny na hliníkové terčíky, které byly následně v naprašovačce Bal-Tec SCD 050 poprášeny tenkou vrstvou zlata. Některá embrya bichirů a jeseterů byla již připravena a vyfocena Mgr. Janem Štundlem, který poskytl svá data pro analýzu obsaženou v této diplomové práci

### **2.3. Histologické řezy**

Fixovaná embrya byla 3x 10 minut promývána v PBS. Následovala vzestupná alkoholová řada vedoucí k dehydrataci vzorků, která začala 25% etanolem a skončila 100% etanolem, kdy každý krok trval 10 minut. Vzorky byly následně zality do pryskyřice JB-4 připravené dle laboratorního protokolu. Polymerace pryskyřice byla urychlena použitím plynného dusíku v exikátoru Laboratoře elektronové mikroskopie PŘF UK. Zatuhlé bločky byly následně pomocí mikrotomu nařezány na plátky o tloušťce 5  $\mu\text{m}$ , které byly přeneseny na předeřáté podložní sklíčko. Sklíčka s preparáty byla přibližně 3 minuty barvena histologickou barvou Azure B/Eozin a následně opláchnuta destilovanou vodou, aby byla zastavena barvicí reakce. Nabarvené preparáty byly zakryty krycími sklíčky s nanesenou pryskyřicí DPX a ponechány k zaschnutí ve vodorovné poloze. Histologické řezy bichirů a většiny jeseterů byly připraveny Mgr. Janem Štundlem, který je poskytl pro analýzu popsanou v této diplomové práci.

### **2.4. Imunohistochemie**

Pro barvení pomocí protilátek byla použita embrya fixovaná v metanolu. Embrya byla nejprve 2x 24 hodin noc promývána v Dentově roztoku (80% metanolu a 20% DMSO). Následovalo nahrazení metanolu fosfátovým pufrům pomocí sestupné metanolové řady, kdy první a druhý krok promývání (80% roztok metanolu ve vodě, 70% roztok metanolu ve vodě) trval každý 15 minut, zatímco třetí a čtvrtý krok promývání (50% roztok metanolu v PBS, 30% roztok metanolu v PBS) trval každý 10 minut. Celé vzorky (angl. whole-mount) byly poté promývány roztokem PBS + 0,4% triton, který působí jako detergent, což je nezbytné pro lepší prostupnost protilátek embryem při nadcházejícím barvení. Všechny tři druhy (bichir, jeseter, kostlín) byly v tomto kroku promývány 3 hodiny s výměnou roztoku vždy 1x za hodinu. Po promývání byly přidány primární protilátky rozpuštěné ve speciálním roztoku Antibody diluent (DAKO) v poměru 1:100. Byly použity následující polyklonální protilátky anti-fibronectin (DAKO) a anti-beta catenin (Thermofisher). Další barvení pomocí monoklonálních protilátek

(např. anti-tubulin (Thermofisher), anti-laminin (Thermofisher)) nefungovalo patrně kvůli jednotné stavbě jejich antigen-vazebného místa, které je vytvořeno, aby přesně odpovídalo antigenům v modelových organismech, kterými bichir, jeseter ani kostlín nejsou. Doba působení primární protilátky se lišila podle velikosti embrya. Největší embrya kostlína byla promývána v roztoku s primárními protilátkami 4x 12 hodin. Menší embrya jesetera a bichira byla promývána 2x 12 hodin. Pro odmytí nenavázaných protilátek byla kostlíní embrya promývána 5 hodin PBS + 0,4% triton, kdy 1x za hodinu byl roztok vyměněn. U jesetera a bichira bylo použito promývání stejným způsobem a po stejně dlouhou dobu, rozdíl byl ale v použití čistého PBS, čímž se zamezilo rozpadu buněčných membrán příliš dlouhým působením detergentu. Vizualizace tkáňových struktur byla umožněna přidáním sekundární protilátky s navázaným buď zeleným nebo červeným fluorochromem, která byla rozpuštěná v roztoku DAKO Antibody Diluent v poměru 1:500. V připraveném roztoku byla kostlíní embrya promývána 2x 12 hodin, jeseteří a bichiří embrya 1x 12 hodin. Pro odmytí sekundárních protilátek byla embrya promývána 3 hodiny v roztoku PBS, kdy byl roztok jedenkrát za hodinu vyměněn. Následovalo postupné převedení embryí do 100% etanolu a následně zalití do polymeru Technovit 7100 dle laboratorního protokolu. Zatuhlé bločky pak byly nařezány na 5 µm tenké řezy stejným způsobem jako v případě histologických řezů. Vzorky na podložních sklech byly ošetřeny roztokem DAPI s fluoroshieldem (Sigma Aldrich), přikryta krycími sklíčky a na závěr bylo rozhraní sklíček ošetřeno bezbarvým lakem na nehty, který zabraňuje vyschnutí preparátu.

## **2.5. Analýza materiálu**

Snímky vzorků připravených pro skenovací mikroskop byly pořízeny na skenovacím elektronovém mikroskopu JEOL 6380 LV. Všechny přístroje patří Laboratoři elektronové mikroskopie PŘF UK vedené Dr. Hylíšem. Histologické řezy připravené jak za pomoci JB-4 tak polymeru Technovit byly analyzovány pomocí mikroskopu Olympus BX51 a fotografovány kamerou Spot. Veškerý materiál byl finálně upravován v programech Adobe Photoshop a FastStone Image Viewer. Tabule jsou zhotoveny pomocí programu Adobe Photoshop.

## 3. Výsledky

### 3.1. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Snímky ze skenovacího mikroskopu poskytují dobrý materiál pro zevní popis vyvíjejících se embryí a pomohly pochopit procesy, které lze pozorovat na embryích od konce gastrulace po uzavření neurálních valů.

#### 3.1.1. Vnější morfologie bichira, jesetera a kostlína

Po ukončení gastrulace je v posteriorní oblasti raných embryí patrný blastoporus (**Tab. 1A, E, F**), od něhož se anteriorně ustanovuje otevřená neurální ploténka. Ta je nejlépe patrná u bichira. Zde celá neurální ploténka vystupuje nad povrch okolní žlutkové koule a pouze jejím středem vede anterioposteriorně mělká prohlubeň, která je nepatrně rozšířená v anteriorní oblasti. Už ve stádiu 18 je zřejmé, že se posteriorní oblast vyvíjí později než anteriorní, což potvrzuje všeobecně přijímané pravidlo o anterioposteriorním vývoji (např. **Gilbert, 2014**) (**Tab. 1A**). Během následujícího vývoje (st. 19) se definují neurální valy, které zřetelně lemují neurální ploténku. Díky tomu lze popsat široce rozevřenou anteriorní oblast neurální ploténky, která se posteriorně zužuje (**Tab. 1B**). Neurální valy se vyzdvihnou a přibližují k sobě. Toto uzavírání v oblasti budoucí hlavy trvá déle než v posteriorní oblasti, neboť v anteriorní části jsou laterální okraje od sebe relativně vzdálené již na počátku neurulace (**Tab. 1C**). Po splynutí neurálních valů (st. 22) je patrné, že celé embryo zůstalo vystouplé nad povrchem okolního žlutku tak, jak to bylo zřejmé již u otevřené neurální ploténky (srovnej **Tab. 1A** a **1D**). V anteriorní oblasti uzavřené neurální trubice je znatelné rozšíření, které je rozděleno do tří částí odpovídajícím třem částem embryonálního mozku a z něho odstupující tři proudy buněk hlavové neurální lišty (srovnej s Štundl 2013). V posteriorní části je pak vidět nediferencovaná populace buněk označovaná jako ocasní pupen (**Tab. 1D**).

U jesetera ve stádiu 18 lze zřetelně rozpoznat jen přední okraj neurální ploténky. Laterální okraje je možné pouze tušit, neboť jsou kontinuální s okolními tkáněmi. V naprostém opaku oproti bichirovi, kde dochází k vystoupení neurální ploténky nad okolní povrch, je u jesetera viditelné zanoření neurální ploténky. V anteriorní oblasti neurální ploténky je zřejmý krátký mediální žlábek. Posteriorně za ním, tj. anteriorně před blastoporem, se opět nachází nediferencovaná populace buněk (**Tab. 1E**). Zmíněný

mediální žlábek se prodlužuje posteriorním směrem a ve stádiu 19 můžeme pozorovat zanořenou neurální ploténku, která je podobně jako u bichira rozšířená v anteriorní části. Oproti bichirovi jsou ale u jesetera patrné pouze vnitřní hrany neurálních valů, což je zapříčiněné zanořováním neurální ploténky pod okolní povrch (**Tab. 1F**). Vnější hrany neurálních valů jsou pak pozorovatelné během závěrečné fáze (st. 21) uzavírání neurální trubice. Podobně jako u bichira i zde dochází nejprve k uzavírání posteriorní oblasti budoucí neurální trubice (**Tab. 1G**). V anteriorní oblasti uzavřené neurální trubice (st. 22) jesetera je také patrné rozdělení na tři oddíly. Zdaleka ale není tak výrazné jako tomu je u bichira. V posteriorní oblasti se nachází prominující oblast, kde neurulace probíhá pomocí splývání neurálních valů, jak je patrné z **Tab. 1H**.

U kostlína také vzniká neurální ploténka ztluštěním dorzálního epitelu v blízkosti blastoporu (st. 14). V tomto případě ale není v mediální rovině neurální ploténky patrný žádný neurální žlábek. Následně se neurální ploténka prodlužuje anteriorně směrem k evakuační zóně. To je prohlubeň ležící na opačné straně embrya než blastoporus, do níž ze strany prorůstá neurální ploténka (**Tab. 1CH**). Během dalšího vývoje je zřejmé, že budoucí tělo vystupuje nad okolní tkáň žloutku. Ve stádiu 15 lze rozeznat hlavovou oblast, která je užší a lépe rozpoznatelná od okolí než oblast ocasního pupenu v posteriorní části embrya. (**Tab. 1I**). Ve stádiu 16 dochází k diferenciaci hlavy. Za ní se posteriorně nachází malé laterální zúžení embrya, které plynule pokračuje v ocasní pupen (**Tab. 1J**). Ve stádiu 17 se v nejanteriornější části embrya diferencují tři mozkové váčky. S růstem mozku se rozšiřuje anteriorní oblast neurální trubice a zároveň se celé tělo embrya anteroposteriorně prodlužuje. Ve střední a posteriorní oblasti jsou změny méně patrné (**Tab. 1K**).

## **3.2. Histologické řezy (JB-4 pryskyřice)**

Pomocí histologické analýzy za použití JB-4 pryskyřice bylo možné popsat procesy neurulace na úrovni tkání a často až na úrovni buněčné, což podtrhlo a částečně ozřejmilo procesy, které jsou patrné již z vnější morfologie. Díky vizualizaci pozic jednotlivých buněk v rámci tkáně se lze blíže vyjádřit k procesům, které vedou k ustanovení neurální trubice u jednotlivých zástupců.

### **3.2.1. Histologické řezy neurulami bichira**

Řezy stádiem 19 u bichira (**Tab. 2A**) vyjevily, že je neurální ploténka vytvořena

jednovrstevným epitelem, který je tzv. pseudostratifikovaný. Laterálně umístěné neurální valy jsou na dorzální straně v kontaktu s epidermis (**Tab. 2B**). V posteriornější oblasti embrya je již rozpoznatelná chorda a dorzálně nad ní přítomný neurální žlábek vzniklý změnou tvaru buněk nacházejících se přímo nad chordou (**Tab. 2C**). S relativním zvětšováním chordy se neurální ploténka laterálně zužuje, ventrálně od ní se nacházejí mezenchymatické buňky, které v následném vývoji dají vzniknout somitům. Neurální valy již tolik nevystupují nad povrch (**Tab. 2D**).

Ve stádiu 20 (**Tab. 2E**) dochází k ohýbání neurální ploténky tak, že uzavírající se neurální trubice vystupuje nad okolní tkáň. Podél celé osy embrya je přítomné mediální místo ohybu neurální ploténky, které se většinou nachází těsně nad chordou. To vytváří neurální žlábek, který je v anteriorní části lemovaný téměř rovnými neurálními valy. Pouze jejich nejdorzálnější část je lehce ohnutá (**Tab. 2F**). Toto ohnutí se v posteriornější části zvýrazní a tím vzniknou dorzolaterální místa ohybu. Jejich funkcí je navzájem přiblížit laterální okraje neurální ploténky tak, aby bylo možné uzavřít neurální trubici, což je v tomto případě docíleno ohnutím neurální ploténky pod vrcholky neurálních valů, které díky tomu směřují navzájem proti sobě (**Tab. 2G**). V nejvíce posteriorní oblasti, kde je neurální ploténka užší, je pro uzavření neurální trubice dostačující zakulacený neurální žlábek a namísto konkrétních oblastí ohybu zde probíhá spíše rolování neurální ploténky, pod níž je vytvořena velká chorda a také somity (**Tab. 2H**).

Ve stádiu 22 (**Tab. 2CH**) nacházíme neurální valy v těsném kontaktu. Přítomnost nebo nepřítomnost mediálního a dorzolaterálních míst ohybu má vliv na tvar lumen formující se neurální trubice. V anteriorní oblasti, kde neurální ploténka měla při uzavírání tvar písmene "V", je lumen podlouhlé (**Tab. 2I**). Lumen neurální trubice uzavřené pomocí dorzolaterálních míst ohybu má trojúhelníkový tvar. Vrcholky neurálních valů splývají takovým způsobem, že je na povrchu embrya stále patrný žlábek, ačkoliv neurální trubice už je zcela uzavřená (**Tab. 2J**). Kulaté lumen nejposteriornější oblasti odpovídá uzavírání neurální trubice mechanismem rolování neurální ploténky (**Tab. 2K**). Na všech řezech je zřejmé relativní zvětšování chordy vůči svinující se neurální ploténce v anterioposteriorním směru.



### 3.2.2. Histologické řezy neurulami jesetera

Ve stádiu 19 (**Tab. 3A**) nacházíme vícevrstevnou neurální ploténku. Neurální valy jsou vytvořeny spíše než vyzdvižením nad povrch okolních tkání tím, že neurální ploténka klesá pod povrch, což je výrazný rozdíl oproti výše popisovanému bichirovi (srovnej **Tab. 2** a **Tab. 3**). V nejanteriornější oblasti, kam nezasahuje neurální žlábek, je dokonce patrný hrbolek vytvořený namnoženými buňkami. Laterálně od něj nacházíme okraje neurálních valů (**Tab. 3B**). Dále posteriorně je neurální ploténka plochá a okraje neurálních valů nelze přesně určit. V mediální ose je neurální ploténka utvořena menším počtem buněčných vrstev než její laterální oblasti, což je zřejmé i na prohnutí bazální laminy nacházející se pod vícevrstevnatým epitelem (**Tab. 3C**). V navazující oblasti je neurální ploténka užší a také obsahuje menší počet buněčných vrstev. Až zde je na řezech patrný mělký neurální žlábek, pod kterým je rozpoznatelná chorda lemovaná mezenchymatickými buňkami, jež dají v dalším vývoji vzniknout somitům (**Tab. 3D**).

Ve stádiu 21 (**Tab. 3E-H**) dochází k přibližování neurálních valů. Neurální žlábek není ani ve svém největším rozpětí zdaleka tak výrazný, jako tomu je u bichira. Nikde není patrné žádné mediální místo ohybu. V nejanteriornější oblasti lze pozorovat dorzolaterální místa ohybu, která ale neohnou vrcholky neurálních valů tak, aby zřetelně vystupovaly nad povrch a mířily proti sobě. Spíše umožní vytvoření neurálních valů tak, že plynule bez výrazného převýšení navazují na okolní tkáň. To také činí obtížnější rozpoznat vnější okraje neurálních valů (**Tab. 3F**). Dále posteriorně zcela mizí i tato dorzolaterální místa ohybu a neurulace probíhá rolováním neurální ploténky, které je u bichira použito pouze v oblastech nejužší neurální ploténky (srovnej **Tab. 2H**). V oblasti hlavy ještě vystupují neurální valy nad povrch do takové míry, že lze na histologických řezech označit jejich vnější okraj (**Tab. 3G**). V oblasti somitů, kde je neurální ploténka výrazně menší, už je to ale obtížné (**Tab. 3H**).

Ve stádiu 22 (**Tab. 3CH**) lze vidět, že lumen formující se neurální trubice v nejanteriornější oblasti svým tvarem dokládá přítomnost dorzolaterálního místa ohybu, které se podílelo na uzavírání neurálních valů. Pozice lumen v mediální oblasti neurální trubice odpovídá oblasti budoucího mozku, kde mohutné neurální valy vytváří budoucí mozkovou tkáň, která zatlačuje lumen do středu neurální trubice (**Tab. 3I**). V

posteriorní oblasti lze již pozorovat kulaté lumen, které odpovídá uzavírání neurální ploténky rolováním. Vrcholky neurálních valů zde mají méně buněčných vrstev než vrcholky neurálních valů v anteriorní oblasti, což umožňuje, aby lumen vzniklo těsně pod dorzálním epitelem (**Tab. 3J**). Téměř plochá posteriorní oblast se somity pokračuje v trendu zmenšování neurálních valů a kulaté lumen i zde odkazuje na rolování neurální ploténky (**Tab. 3K**).

### 3.2.3. Histologické řezy neurulami kostlína

Příčné zužování embrya, které je zřejmé při pozorování vnější morfogeneze (**Tab. 4A, E, CH**) připomíná přibližování neurálních valů u bichira a jesetera, nicméně u kostlína ale nedochází k přibližování neurálních valů nýbrž okrajů jeho těla. Neurální trubice se zde ustanovuje zcela jiným způsobem.

Neurální ploténka u kostlína se zakládá jako vícevrstevná tkáň ohraničená ventrálně bazální laminou, která je dobře ustanovená ve stádiu 15. Buňky v povrchové vrstvě jsou zakulacené a nevykazují apikobazální polarizaci, čímž připomínají mezenchymatické buňky. U kostlína je také přítomna mnohvrstevná neurální ploténka, ale na rozdíl od jesetera je její dorzální oblast vystouplá nad povrch (**Tab. 4B**). Neurální primordium si dále zachovává svou šířku, ale ventrálně se protahuje do tvaru široce rozepjatého kýlu (**Tab. 4C**). V souladu s popisy posteriorních oblastí u bichira a jesetera i u kostlína nacházíme zmenšení neurálního primordia, zde ve tvaru neurálního kýlu, pod nímž se ventrálně nachází relativně velká chorda (**Tab. 4D**).

Další vývoj ve stádiu 17 je v anteriorní oblasti charakteristický zmnožením počtu buněk a vytvořením oválné neurální tkáně, která vystupuje nad okolní povrch a není v ní patrný žádný centrální lumen (**Tab. 4F**). Podobnou situaci nacházíme posteriorně, kde kromě dalšího ventrálního prodloužení neurálního kýlu dochází také k laterálnímu zúžení dané struktury. V této fázi je zřejmá organizace buněk ve ventrální oblasti neurálního kýlu, kde jsou z buněk vytvořené dva sloupce. V dorzální oblasti neurálního kýlu je tkáň stále neorganizovaná. Charakter povrchové vrstvy buněk se oproti mladšímu stádiu změnil a je zde patrný posun k uhlazenému epiteliálnímu typu tkáňového uspořádání (**Tab. 4G**). V posteriorní oblasti pak lze zaznamenat shlukování mezenchymatických buněk laterálně od chordy do kompaktních somitů a laterální zúžení neurálního kýlu (**Tab. 4H**).

Během stádia 18 se vytváří lumen neurální trubice, které je u kostlína typické tím, že se tělo znatelně vyvýší nad okolní povrch a zároveň se prodlouží v anteroposteriorním směru (srovnej **Tab. 1**). V nejpřednější části tak hlava přesahuje žloutkovou kouli a na řezu je zřejmé, že zde neurální trubice již vytváří laterální výchlipky, které souvisí se vznikem očí. Ventrálně neurální trubice doléhá na primordium cementového orgánu. Centrální lumen je již v nejpřednější části dobře rozvinuté (**Tab. 4I**). Vzhledem k tomu, že mladší stádia mají ve stejné oblasti pouze shluk buněk, je zřejmé, že lumen vzniklo sekundárně (srovnej **Tab. 4B, F, I**). Neurální kýl se zúžil především v anteriorní části a vznikla tak oválná strukturovaná neurální tkáň, v jejíž mediální rovině se v prostoru mezi dvěma sloupci buněk otevírá lumen. Tím se definitivně ustanovuje neurální trubice (**Tab. 4J**). Neurální trubice v posteriorní části není ani náznakem dorzoventrálně protáhlá tak, jak je to patrné ve střední části embrya (srovnej **Tab. 4J, K**). Její tvar je přirozeně kulatý, i když lumen vzniká i zde atypicky sekundárně, což je patrné z jeho nepravidelného tvaru (**Tab. 4K**).

### **3.2.4. Rozdíly ve stavbě neurálních plotének bichira, jesetera a kostlína**

Neurální ploténka bichira je pseudostratifikovaná s buněčnými jádry rozmístěnými v různých úrovních podél apikobazální osy (**Tab. 5A**). Bazální lamina definuje jednovrstevný epitel tvořený apikobazálně prodlouženými buňkami (**Tab. 5A'**).

U jesetera taktéž nacházíme epiteliální neurální ploténku s apikobazálně prodlouženými buňkami. Orientované uspořádání buněk je společnou vlastností neurální ploténky bichira a jesetera (**Tab. 5B**). Rozdíl oproti bichirovi spočívá ve větším množství buněčných vrstev (**Tab. 5B'**).

U kostlína se stále zachovává bazální lamina, která je jednou z typických vlastností epitelu (**Tab. 5C**). Apikobazální orientace buněk již ale schází. Neurální tkáň je mnohvrstevná podobně jako u jesetera, ale buňky mají nepravidelný tvar (**Tab. 5C'**).

## **3.3. Imunohistochemie**

Díky barvení pomocí protilátek bylo možné analyzovat tvary buněk a definovat pozice bazálních lamin. Ačkoliv výsledný tvar neurálních trubic je stejný u všech tří ryb, procesy, které za tímto výsledkem stojí, se liší právě nejvíce na buněčné úrovni. Výsledky imunohistochemického barvení, tak pomohly k vyslovení závěrů týkajících se

drobných změn vedoucích k diverzifikaci procesů neurulace.

### **3.3.1. Buněčná stavba během morfogeneze neurální ploténky bichira**

Neurální ploténka u bichira je ve stádiu 20 zpravidla ohnutá ve třech bodech. Jedním je střední místo ohybu nacházející se přímo nad chordou, druhými dvěma body jsou dorzolaterální místa ohybu (**Tab. 6A**).

Neuroepiteliální buňky ve středním místě ohybu jsou charakteristické apikální konstrikcí, což je dobře patrné díky červeně značenému beta-cateninu v buněčných membránách. Bazálně umístěná jádra značená pomocí DAPI naznačují, že buňky procházejí S fází buněčného cyklu (tj. syntéza DNA). Buňky nabývají tvar klínu a jsou vždy v těsné blízkosti chordy (**Tab. 6B**).

Dorzolaterální místo ohybu vzniká v oblasti, kde jsou neuroepiteliální buňky v blízkosti povrchové vrstvy ektodermu, která se rozpíná z oblasti laterálně od neurálního epitelu přes vrcholek neurálního valu až na jeho mediální stranu. I zde jsou buňky apikálně zúžené, ale jejich tvar je spíše velmi protažený, případně vytváří více vrstev. V buňkách dorzální části neurálního valu a v buňkách nacházejících se laterálně od uzavírající se neurální ploténky lze pozorovat přítomnost beta-cateninu v jádrech (růžová jádra), což je odlišuje od ostatních buněk podílejících se na morfogenezi neurální trubice (**Tab. 6C**). Přítomnost beta catenin v jádrech buněk v okolí neurálních valů s největší pravděpodobností indikuje morfogenetickou aktivitu buněk.

### **3.3.2. Vznik neurálních valů bichira**

Laterální okraje neurální ploténky bichira se v průběhu neurulace zvedají nad okolní povrch (**Tab 2**). Výchozím stavem neurulace je otevřená jednovrstevná neurální ploténka (**Tab. 7A**). Pro lepší popis vzniku neurálních valů bylo stádium 19 rozděleno do tří substádií, tj. 19.1, 19.2, 19.3. V počáteční fázi 19.1 lze vidět pouze malé množství buněk (**Tab. 7B**). Buňky, které se nacházejí v této oblasti, při dalším vývoji (st. 19.2) nápadně zvyšují své počty, což je patrné ze zvětšení množství buněčných jader a také z rozšíření neurálního valu (**Tab. 7C**). Ve stádiu 19.3 se pak ztrácí původní jednovrstevný charakter, neurální val se rozšiřuje a zvedá se nad okolní povrch (**Tab. 7D**).

### **3.3.3. Migrace buněk neurální lišty bichira**

Během uzavírání neurální trubice (st. 20) se v anteriorní oblasti bichira odděluje

populace buněk neurální lišty. Celý proces je započat rozpadem bazální laminy, následuje vyvázání buněk z epitelu a jejich emigrace v podobě mezenchymatických buněk (proces EMT). U bichira překvapivě neodmigrovávají buňky v anteroposteriorním pořadí. Zatímco v nejanteriornější oblasti dochází k rozpadu bazální laminy (**Tab. 8B**), v posteriornější oblasti (oblast hyoidního proudu) lze pozorovat nesouvislou bazální laminu a mezenchymatické buňky, které mohou být součástí buněk neurální lišty (hyoidní proud) (**Tab. 8D**). V trupové oblasti je bazální lamina stále souvislá (**Tab. 8F**). Buňky trupové neurální lišty ve stejném stádiu zůstávají součástí neurálních valů a odmigrovávají až po jejich uzavření. Pro bližší a podrobnější informace o migraci buněk neurální lišty bichira viz Štundl 2013).

### **3.3.4. Splývání neurálních valů bichira**

Neurální valy sestávají ze dvou částí. Dorzálně se nachází povrchová vrstva ektodermu a ventrálně se nachází neurální tkáň (**Tab. 9A**). U bichira se povrchová vrstva ektodermu dostává ve stádiu 21 až do vnitřní části neurálních valů (**Tab 9B**).

Během dotyku neurálních valů ve stádiu 22 je povrchová vrstva první tkáně, která se dostává do kontaktu s protilehlým neurálním valem (**Tab. 9C**). Buňky splývající povrchové vrstvy mají oválný tvar a nejsou na nich patrné žádné výběžky nebo filopodia (**Tab. 9D**).

### **3.3.5. Buněčná stavba během morfogeneze neurální ploténky jesetera**

Stejně jako u bichira i u jesetera se během neurulace objevují neurální valy na okrajích neurální ploténky, která je narozdíl od bichira mnohvrstevnatá (**Tab. 3**). Rozdíl v neurálních valech mezi výše zmíněnými druhy je především v míře, s jakou vystupují nad okolní povrch (**Tab. 3**). Zatímco u bichira byl tento výstup nad povrch markantní, u jesetera jsou neurální valy jen stěží rozeznatelné od epidermis (**Tab. 10A**).

U jesetera není oproti bichirovi patrné žádné střední místo ohybu. Buňky v této oblasti jsou lehce protažené, ale jen některé nabývají tvar klínu. Jádra buněk jsou rozmístěna v různých místech podél apikobazální osy. K apikální konstrikcí dochází téměř výlučně u buněk, které jsou v bezprostředním kontaktu s budoucím lumen (**Tab. 10B**).

V dorzolaterální oblasti je zřejmé, že je ohnutá neurální ploténka těsně pod

vrcholem neurálního valu rozšířená (**Tab. 10C**). Ventrálně od tohoto rozšíření buňky nabývají apikobazálně prodloužený tvar. Ty, které jsou v kontaktu s budoucím lumen, jsou apikálně zúžené stejně jako ve ventrální oblasti neurálního žlábků. Jádra buněk nacházejících se v oblasti zúžení obsahují aktivní beta catenin, který stejně jako ve srovnatelném stádiu u bichira (**Tab. 7**) odkazuje na EMT, patrně spojenou s diferenciací buněk neurální lišty (**Tab. 10C**). Je zajímavé, že se beta catenin nachází také v jádrech buněk, u kterých se běžně EMT nepředpokládá, jako např. buňky bezprostředně v kontaktu s budoucím lumen nebo buňky epidermis typické svými velkými jádry (**Tab. 10C**).

### **3.3.6. Buněčná stavba během morfogeneze neurální ploténky jesetera podél anteroposteriorní osy**

Při pohledu na povrch embrya jesetera stádia 20 (**Tab. 11A**) je patrné, že zanořování neurální ploténky začíná v anteriorní oblasti. Zde je patrný epiteliální okraj neurálních valů, který posteriorním směrem mizí a ve zcela posteriorní části rozeznáme buňky neurální ploténky, které se jeví jako populace jednotlivě ohraničených téměř mezenchymatických buněk odlišná od na pohled souvislé a hladké epidermis (**Tab. 11B**).

Nejanteriorněji nacházíme hluboký a symetrický neurální žlábek, který je vytvořený několikavrstevnou neurální ploténkou (**Tab. 11C**). Vrstvy jsou uspořádané a zřetelně kopírují tvar neurálního žlábků (**Tab. 11C'**). V mediální oblasti jsou tvořeny protáhlými epiteliálními buňkami, jejichž protáhlý charakter se ztrácí v laterálních oblastech neurální ploténky. V laterálních oblastech je také zřejmá přítomnost beta cateninu v jádrech, což naznačuje, že buňky nemají úplný epiteliální charakter (**Tab. 11C**).

Dále posteriorně se jasná hranice epitelu rozpadá do nepravidelně uspořádaných buněk různých tvarů (**Tab. 11D**). Protáhlý tvar, který je typický pro anteriornější oblast, se zde téměř nevyskytuje. Stejně tak vrstvy buněk nekopírují tvar neurálního žlábků, ale jsou spíše vzájemně promíchané (**Tab. 11D'**). Buňky oblasti budoucího lumen jsou oválné bez apikální konstriktce, což je připodobňuje mezenchymatickým buňkám a zároveň je to odlišuje od stejné populace buněk v anteriornější oblasti (**Tab. 11D'**). Dalším rozdílem je přítomnost beta cateninu v jádrech, který podtrhuje pozorované změny v charakteristice buněčných typů mezi

nejanteriornější a posteriornější oblastí neurální ploténky (**Tab. 11D**).

V posteriorní oblasti pak neurální ploténka nabývá opět epiteliální charakter s několika vrstvami buněk (**Tab. 11E**). Protáhlý tvar mají ale pouze nejventrálněji umístěné buňky, zatímco dorzálnější buňky jsou oválné (**Tab. 11E'**). Svrchní vrstva buněk vykazuje přítomnost beta cateninu v jádrech (**Tab. 11E**).

Tendence ve snižování počtu vrstev směrem posteriorně je patrný i v nejposteriornější oblasti, která je typická pouhými dvěma vrstvami buněk (**Tab. 11F**). Svrchní vrstva, stejně jako v anteriornější oblasti, vykazuje signál beta cateninu v buněčných jádrech (**Tab. 11F'**). Částečně mezenchymatický charakter buněk neurální ploténky je méně zřejmý, stále je ale dobře pozorovatelný při pohledu na povrch embrya (**Tab. 11B**).

### **3.3.7. Splývání neurálních valů jesetera**

Ve stádiu 21 (**Tab. 12A**) jsou dobře patrné ustanovené neurální valy. Narozdíl od splývajících neurálních valů bichira (**Tab. 9**) jsou neurální valy jesetera typické alespoň částečnou přítomností beta cateninu v jádrech buněk (**Tab. 12B**). Stejně jako u bichira i u jesetera se povrchová vrstva ektodermu dostává do vnitřní oblasti neurálních valů (**Tab. 12B**). Při jejich dalším přibližování ve stádiu 21+ (**Tab. 12C**) se obvykle zužuje šířka budoucího lumen a povrchová vrstva ektodermu je první tkání, která splývá při uzavírání neurální trubice (**Tab. 12D**). Na uzavřené neurální trubici ve stádiu 22 (**Tab. 12E**) je patrné, že jako první splývá nejventrálnější oblast povrchové vrstvy ektodermu, což vytváří falešný neurální žlábek dorzálně nad místem uzavření (**Tab. 12F**). Takový falešný žlábek je patrný i při pohledu na povrch embrya (**Tab. 1H**).

### **3.3.8. Buněčná stavba neurálního kýlu kostlína**

Na stádium 17 u kostlína lze pozorovat neurální kýl s dvěma odlišně uspořádanými skupinami buněk (**Tab. 13A**). Ve ventrální oblasti neurálního kýlu jsou buňky uspořádány do dvou paralelních řad, které jsou dorzoventrálně orientované. Buňky, v řadách jsou orientované lateromediálně. Dorzálním směrem se začínají mezi řadami v mediální pozici objevovat buňky, které mají také lateromediální orientaci, nejsou však součástí žádné řady. Tento trend je dorzálním směrem stále výraznější (**Tab. 13B**).

Laterálně v dorzální oblasti neurálního kýlu se populace lateromediálně orientovaných buněk dostává do styku s buňkami, které jsou orientovány

dorzovětrálně (**Tab. 13C**). Tato laterální populace buněk může přispívat při další morfogenezi neurálního kýlu, která spočívá v zužování jeho široké dorzální oblasti.

### **3.3.9. Buněčná stavba neurálního kýlu kostlína podél anteroposteriorní osy**

U jesetera bylo zcela zřejmé, že vývoj neurální trubice je nejpokročilejší v anteriorní oblasti s epiteliálním neurálním žlábkem, zatímco v posteriorní oblasti se nacházely částečně mezenchymatické buňky vytvářející dvouvrstvou neurální ploténku (**Tab. 11**). Tak výrazné rozdíly během neurulace u kostlína nenacházíme. Již při pohledu na vnější povrch embrya ve stádiu 17 (**Tab. 14A**) je patrné, že vývoj neurální trubice dosáhl nejvyššího stupně ve středu embrya, kde je neurální tkáň nejužší. Anteriorním a posteriorním směrem je neurální tkáň stále laterálně rozšířená a úzká neurální trubice bude tedy ustanovena v pozdějších stádiích (**Tab. 14B**).

Při bližším pohledu lze v oblasti prvního mozkového váčku určit bazální laminu označenou zeleně pomocí fibronectinu (**Tab. 14C**), nad níž je zatím ještě neuspořádaná populace buněk odpovídající budoucímu mozku (**Tab. 14C**). V druhém mozkovém váčku je patrný počátek ustanovení neurálního kýlu (**Tab. 14D**). Nová část zeleně označené bazální laminy se ustanovuje jako dorzální prodloužení původní bazální laminy. Dochází tedy k oddělení laterální a mediální populace buněk, kdy mediální populace dá vzniknout samotnému neurálnímu kýlu (**Tab. 14D'**). Přestavba je zřejmá také na buňkách mediální populace, které nasedají na nově vznikající bazální laminu, což je patrné z pravidelného uspořádání jejich jader (**Tab. 14D'**). Třetí mozkový váček je již kompletně přestavěn v neurální kýl s ustanovenou bazální laminou z obou stran. Jedna z laterálních bazálních lamin vznikla později a není tak ještě zcela oddělena od bazální laminy, která se nachází pod přilehlou laterální tkání. (**Tab. 14E**).

Střední oblast anteriorně před ocasním pupenem je typická dobře ustanoveným neurálním kýlem a ventrálně od něj vzniklou chordou (**Tab. 14F**). Buňky neurálního kýlu jsou organizované podél laterálních bazálních membrán. Ventrální bazální membrána oddělující neurální kýl od chordy se v posteriorních oblastech postupně rozpadá (**Tab. 14F'**). Blíže k ocasnímu pupenu pak zcela zaniká bazální lamina mezi chordou a neurálním kýlem a obě populace buněk splývají do jediné (**Tab. 14G**). Laterální bazální laminy již nesměřují vertikálně k povrchu těla, ale sklápí se do horizontální roviny, čímž se ztrácí jasné hranice neurálního kýlu a okolních tkání (**Tab.**



**14G'**). V oblasti ocasního pupenu je pak zcela nemožné určit, která část buněčné populace dá vzniknou neurální trubici, chordě nebo mezodermu (**Tab. 14H**). Bazální lamina zasahuje jen částečně do laterální oblasti. V ocasním pupenu nelze pozorovat žádné pravidelné uspořádání buněk (**Tab. 14H**).

Ocasní pupen a první mozkový váček u kostlína jsou si ve stejném embryonálním stádiu (st. 17) značně podobné. Výrazný rozdíl však najdeme v ustanovení ventrální bazální membrány, která je přítomná v prvním mozkovém váčku (**Tab. 14C**), ale zcela chybí v ocasním pupenu (**Tab. 14H**). Tato ventrální bazální lamina totiž jasně definuje neurální tkáň v prvním mozkovém váčku, která je odlišitelná jak od laterálních tak od ventrálních tkání nepřispívajících k ustanovení neurální trubice. V ocasním pupenu však toto ohraničení chybí a z neuspořádané populace buněk tak vzniká více typů embryonálních tkání, tj. neurální trubice, chorda a mezoderm.

### **3.3.10. Struktury podobné neurálním valům u kostlína**

Při pohledu na vnější povrch embrya kostlína se některé vnější struktury ve stádiu 17+ (**Tab. 15A**) jeví jako neurální valy, tj. vyčnívají nad povrch okolního žloutku, jsou bilaterálně umístěné od mediální osy embrya. Tyto struktury se během vývoje ztrácí, zatímco se embryo laterálně zužuje (srovnej **Tab. 15A, D**). Z vnitřního uspořádání tkání je zřejmé, že valy vystupující nad povrch jsou výchlípky archenteronu zvedající nad ní ležící epidermis (**Tab. 15 B,C**).

Ve stádiu 18+ (**Tab. 15D**) se pak v posteriorní oblasti vytváří další struktury tvarem připomínající neurální valy. V tomto případě se jedná o výchlípku intermediálního mezodermu (**Tab. 15D**). V tomto stádiu (st. 18+) je neurální trubice už dobře ustanovená podél celé anterioposteriorní osy, a tak je záměna výchlípky mezodermu s neurálními valy spíše nepravděpodobná.

### **3.3.11. Buněčná morfogeneze neurálního kýlu kostlína**

Neuspořádané buňky v několikavrstevné neurální ploténce (**Tab. 5C**) se ve stádiu 16 dělí především ventrálním směrem za vzniku neurálního kýlu (**Tab. 16A**). Povrch embrya je tvořený oválnými buňkami, které jsou neuspořádané stejně jako původní neurální ploténka (**Tab. 16A'**). Ve ventrální oblasti však dochází k organizaci buněk podél prodlužující se bazální laminy. Tyto buňky jsou prodloužené a těsně nasedají na bazální laminu, což naznačuje epiteliální charakter (**Tab. 16A''**). Epiteliální charakter

mají ale pouze buňky těsně nasedající na ventrální bazální laminu. Buňky, které se nacházejí mediálně od uspořádaných buněk, si sice zachovávají lateromediální orientaci, jejich vzájemná pozice je ale neorganizovaná (srovnej s **Tab. 13**). V nejventrálnější oblasti neurálního kýlu jsou organizované buňky v těsné blízkosti, dorzálním směrem ale mezi nimi přibývají mezenchymatické buňky (**Tab. 16A''**, šipka). V ranějších stádiích se v mediální oblasti nachází velké množství neorganizovaných buněk, což vytváří dorzoventrálně krátký ale laterálně široký neurální kýl (**Tab. 16A**).

Ve stádiu 17 lze pozorovat zřetelnější rozdělení neurálního kýlu na dorzální a ventrální oblast (**Tab. 16B**). Dorzální vrstvy buněk vytvářejí nejširší oblast neurální tkáně (**Tab. 16B'**). Na povrchu embrya se stále nachází nepravidelně tvarované buňky (**Tab. 16B'**, šipka). Podobný charakter nalézáme i v několika nejdorzálnějších vrstvách buněk neurálního kýlu. Ve ventrální oblasti je patrné, že mezenchymatické buňky zmizely z prostoru mezi buňkami organizovanými podél bazálních lamin. Patrně se vmezeřily mezi ně, přichytily se k bazální lamině a tím nabyly epiteliální charakter. Je zřejmé, že v nejventrálnější části buňky vytvářejí dva sloupce, které jsou uspořádané podél bazální laminy (**Tab. 16B''**).

Ve stádiu 17+ (**Tab. 16C**) lze jistou neuspořádanost buněk neurálního kýlu vidět pouze v nejdorzálnější oblasti (**Tab. 16C'**). Spolu s postupnou uspořádaností buněk se mění také charakter povrchových buněk. Buňky, které jsou v těsném kontaktu s neuspořádanou dorzální oblastí neurálního kýlu, mají nepravidelný tvar (**Tab. 16C'**, šipka). Oproti tomu ty buňky, které jsou součástí povrchové vrstvy ektodermu, jsou pravidelné a dobře začleněné mezi své sousedy (**Tab. 16C'**, hrot šipky). Podobný rozdíl v charakteristice povrchové vrstvy ektodermu a neurálního ektodermu je patrný i během neurulace jesetera (**Tab. 11**). Buňky ventrální oblasti neurálního kýlu jsou již zcela uspořádány do dvou sloupců (**Tab. 16C''**). Organizace neurálního kýlu postupuje dorzálním směrem, což potvrzuje i otvírání lumen, které začíná ve ventrální oblasti (**Tab. 16C'''**, hvězdička).

### **3.3.12. Vznik lumen v neurálním kýlu kostlína**

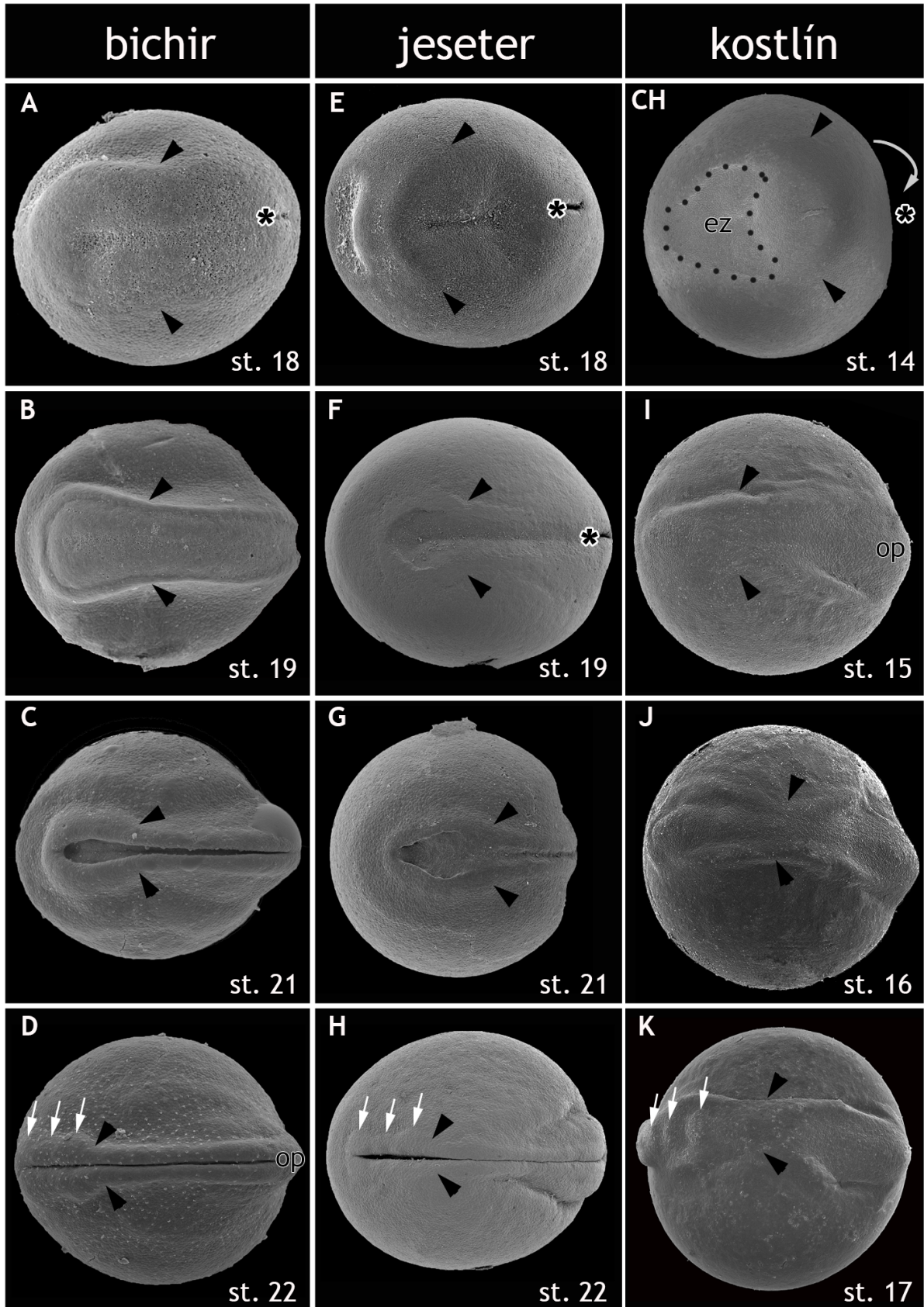
Ačkoliv otvírání neurální trubice začíná ve ventrální části neurálního kýlu, nepokračuje tento proces plynule dorzálním směrem. Namísto toho se ve stádiu 18 (**Tab. 17A**) nachází v neurální trubici více oddělených míst, ve kterých dochází k vytváření centrálního lumen (**Tab. 17A'**). Oba paralelní sloupce vytvářející neurální trubici jsou

charakteristické svou stavbou tzv. pseudostratifikovaného epitelu (**Tab. 17A**). V otevírajícím se lumen jsou patrné můstky cytoplazmy (**Tab. 17A**, šipky).

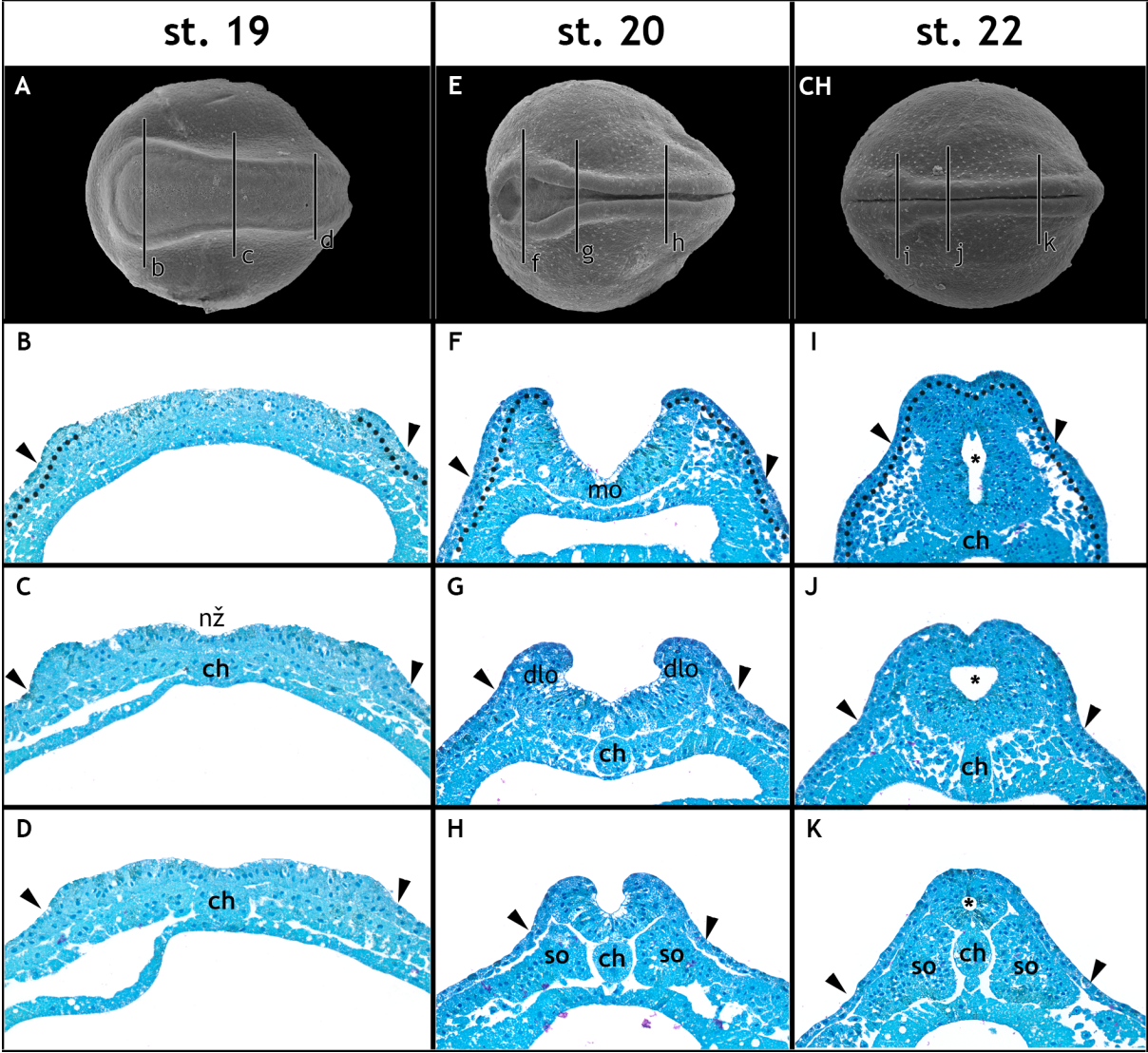
Od stádia 18+ (**Tab. 17B**) lze jasně rozlišit povrchovou vrstvu ektodermu nacházející se dorzálně od uzavřené neurální trubice. Dochází zde tedy k úplné diferenciaci dorzální populace neurálního kýlu na neurální ektoderm a epidermis (**Tab. 17B'**). Na otevřeném lumen je zřejmé, že buňky podílející se na jeho ustanovení nejsou ještě zcela epitelizované (**Tab. 17B''**). Závěrečná morfogeneze lumen probíhá ve stádiu 19 (**Tab. 17C**). Ačkoliv otvírání lumen bylo započato ve ventrální oblasti (**Tab. 16C**), epitelializace lumen začíná v dorzální oblasti neurální trubice (**Tab. 18C'**). Buňky, které jsou v těsném kontaktu s lumen ve ventrální oblasti, ještě nemají ve stejném stádiu zcela epiteliální charakter (**Tab. 17C''**).

## 4. Tabule

**Tabule 1:** Raný vývoj embryí bichira, jesetera a kostlína (SEM). Anteriorní oblast směřuje vždy doleva. **(A-D)** Dorzální pohled na embrya bichira senegalského (*Polypterus senegalus*) od konce gastrulace (A) až po uzavřenou neurální trubici (D). Hroty šipek označují hranice svinující se neurální ploténky. **(E-H)** Dorzální pohled na embrya jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) od konce gastrulace (A) až po uzavřenou neurální trubici (D). Hroty šipek označují hranice svinující se neurální ploténky. **(CH-K)** Dorzální pohled na embrya kostlína mexického (*Atractosteus tropicus*) od konce gastrulace (CH) až po rozšíření anteriorní oblasti neurální trubice (K). Hroty šipek označují hranice tkáně, která vystupuje nad okolní povrch. Bílé šipky – mozkové váčky; ez – evakuační zóna; hvězdička – blastoporus; op – ocasní pupen. Snímky F, G a H byly pořízeny J. Štundlem.

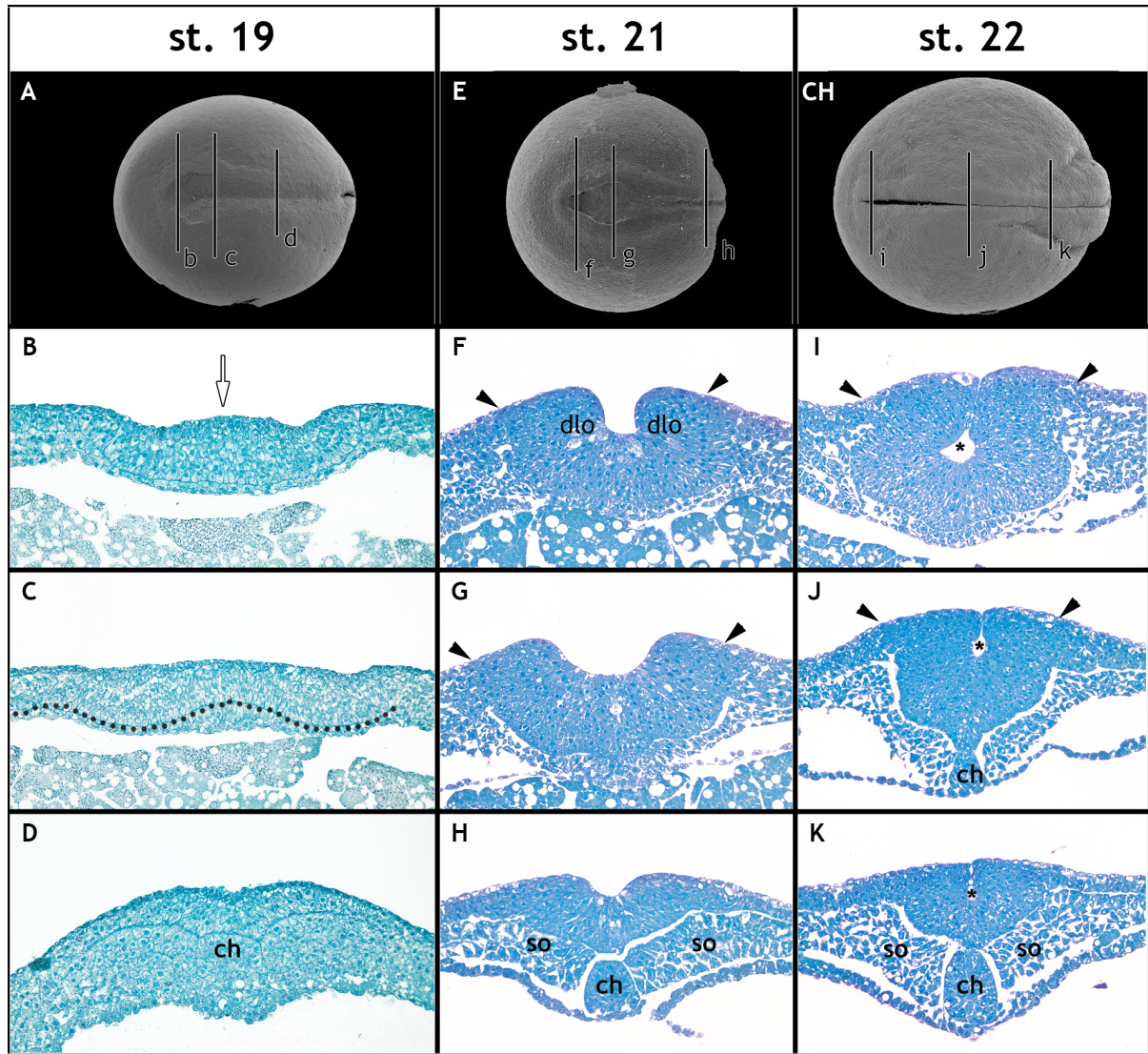


**Tabule 2:** Histologické řezy neurulami bichira. Na snímcích A, E, CH směřuje anteriorní oblast doleva. **(A)** Dorzální pohled na stádium 19 s vyznačenými místy řezů. **(B-D)** Frontální řezy stádiem 19. **(E)** Dorzální pohled na stádium 20 s vyznačenými místy řezů. **(F-H)** Frontální řezy stádiem 20. **(CH)** Dorzální pohled na stádium 22 s vyznačenými místy řezů. **(I-K)** Frontální řezy stádiem 22. Hroty šipek označují hranici, kde dochází k vyzdvihnutí neurální tkáně nad okolní povrch. Před uzavřením neurální trubice toto vyzdvihnutí koresponduje s bází neurálních valů. Tečkovaná čára označuje povrchovou vrstvu buněk. Dlo – dorzolaterální místo ohybu; hvězdička – lumen; ch – chorda; mmo – mediální místo ohybu; nž – neurální žlábek; so – somit. Snímky B, C, D, E, F, G, H, I, J a K byly pořízeny J. Štundlem.

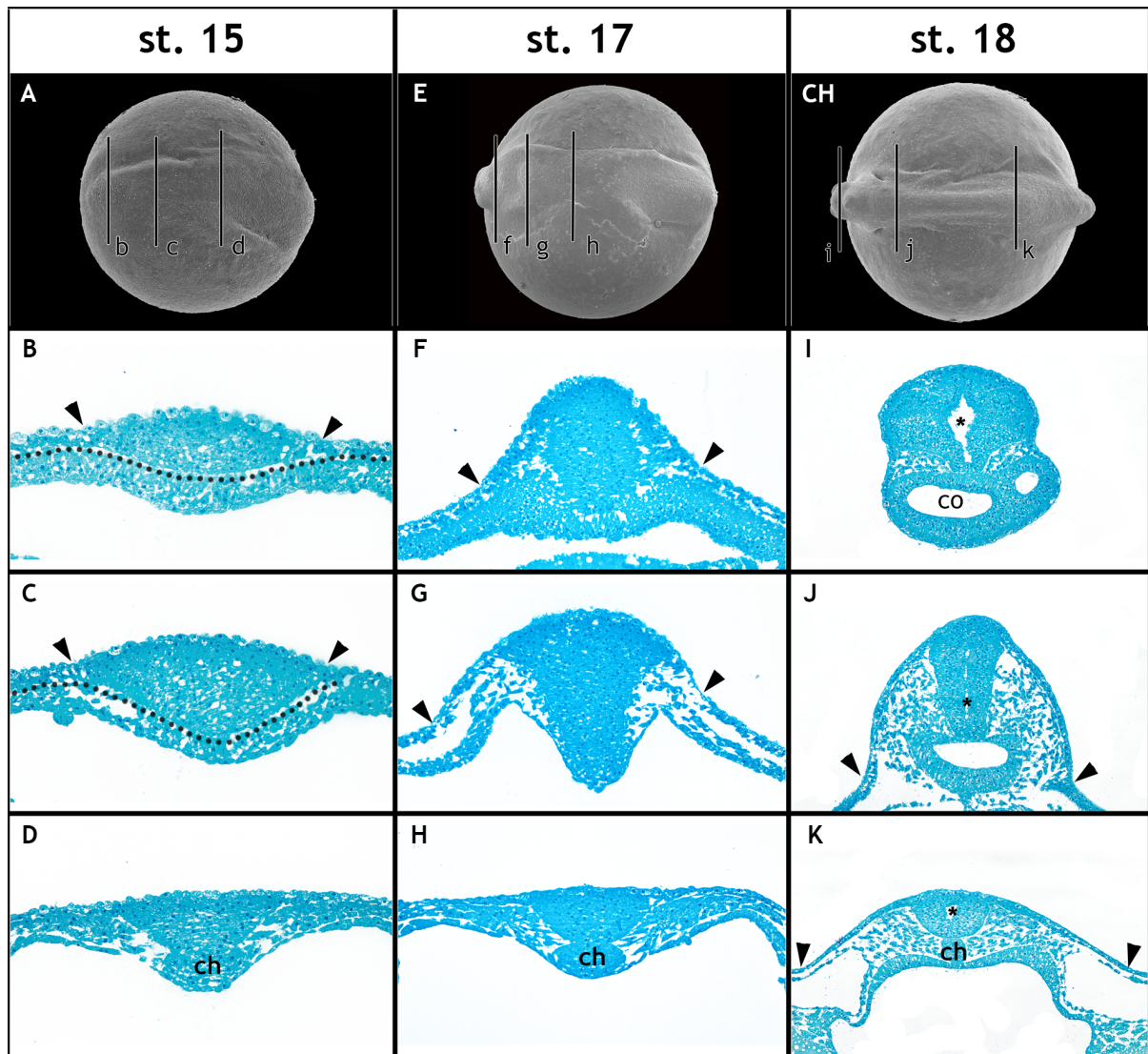




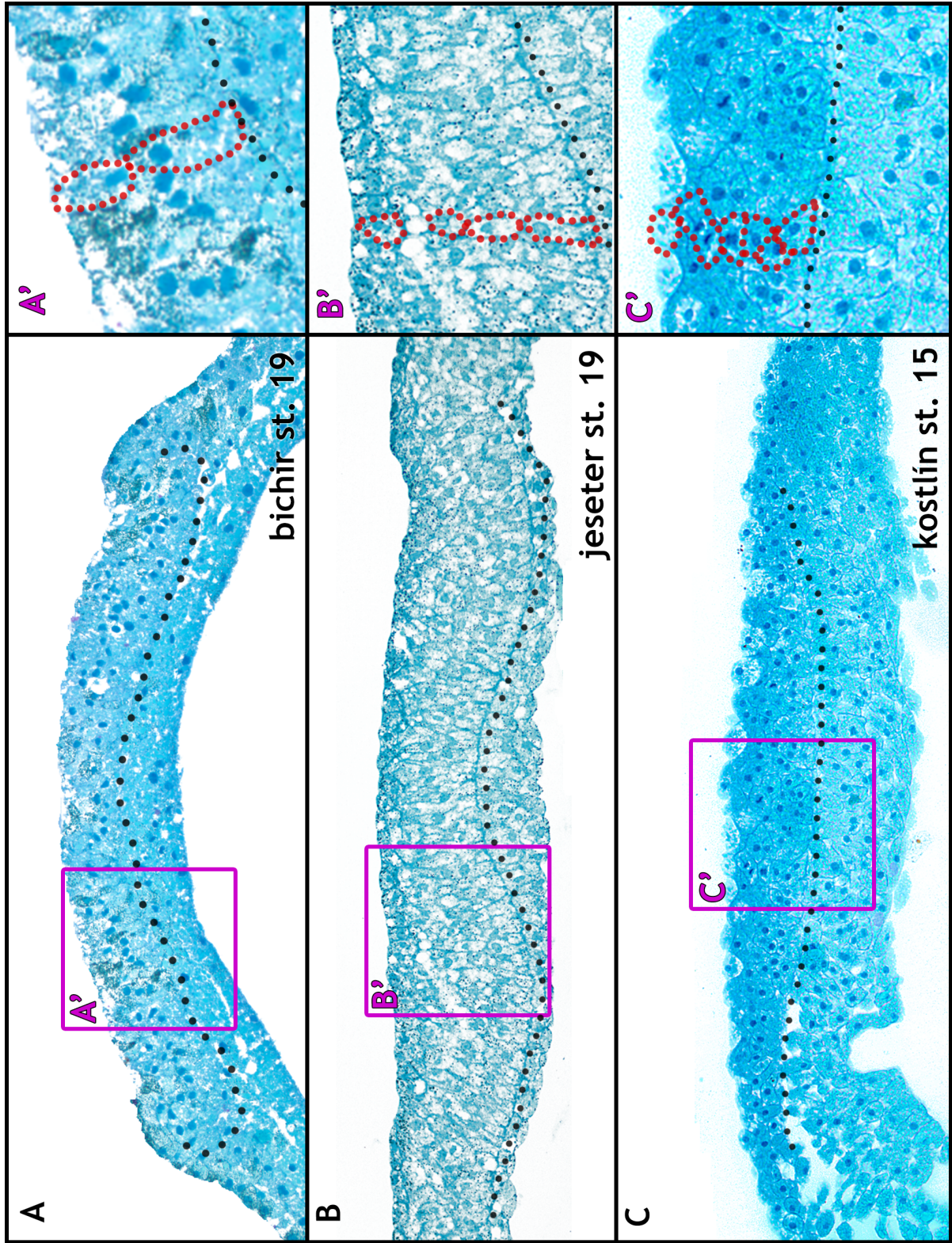
**Tabule 3:** Histologické řezy neurulami jesetera. Na snímcích A, E, CH směřuje anteriorní oblast doleva. **(A)** Dorzální pohled na stádium 19 s vyznačenými místy řezů. **(B-D)** Frontální řezy stádiem 19. **(E)** Dorzální pohled na stádium 21 s vyznačenými místy řezů. **(F-H)** Frontální řezy stádiem 21. **(CH)** Dorzální pohled na stádium 22 s vyznačenými místy řezů. **(I-K)** Frontální řezy stádiem 22. Hroty šipek označují hranici, kde dochází k vyzdvihnutí neurální tkáně nad okolní povrch. Tečkovaná čára označuje bazální laminu. Bílá šipka – hrbolek namnožených buněk; dlo – dorzolaterální místo ohybu; hvězdička – lumen; ch – chorda; so – somit. Snímky A, E, F, G, H, Ch, I, J a K byly pořízeny J. Štundlem.



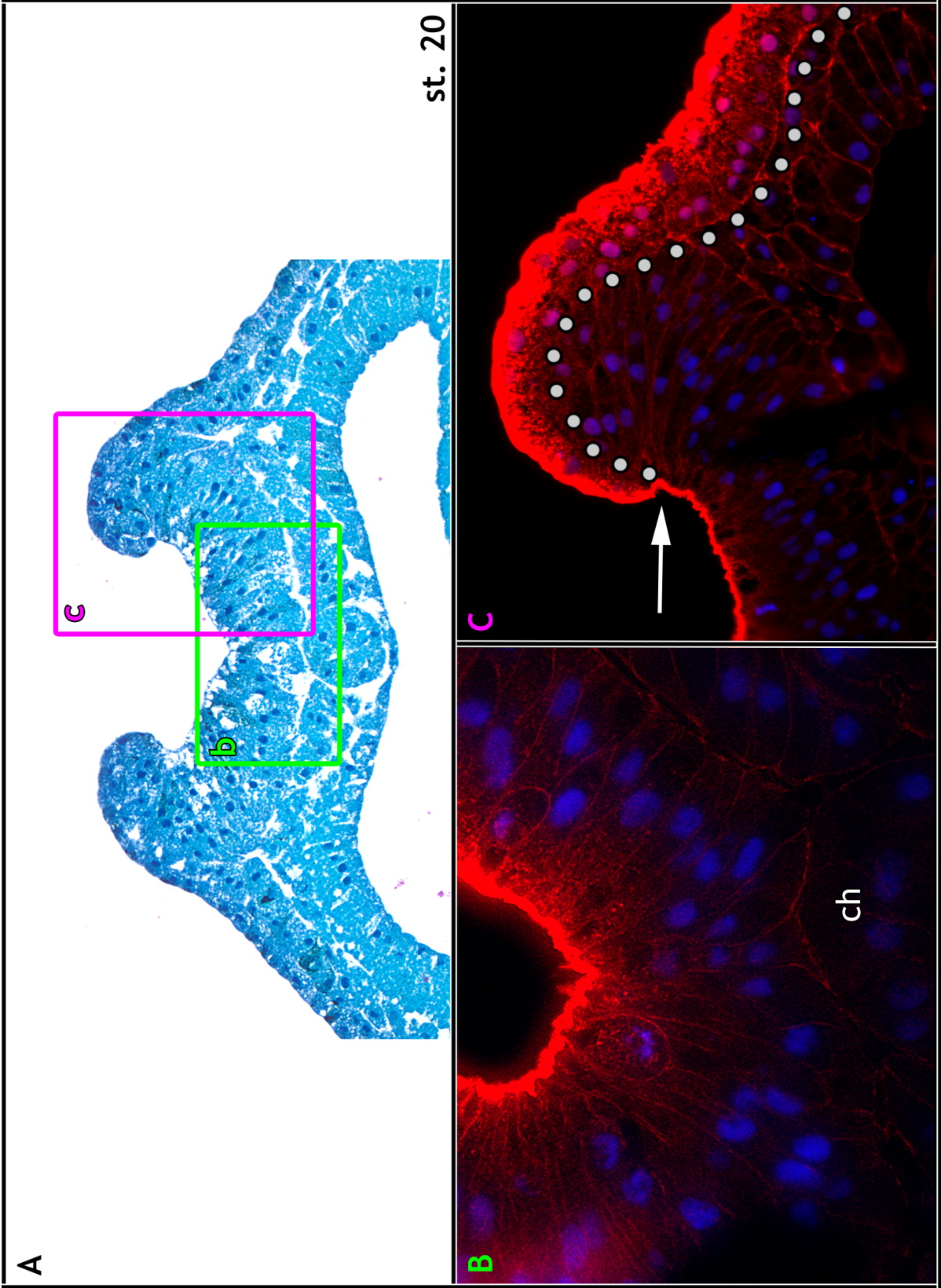
**Tabule 4:** Histologické řezy neurulami kostlína. Na snímcích A, E, CH směřuje anteriorní oblast doleva. **(A)** Dorzální pohled na stádium 15 s vyznačenými místy řezů. **(B-D)** Frontální řezy stádiem 15. **(E)** Dorzální pohled na stádium 17 s vyznačenými místy řezů. **(F-H)** Frontální řezy stádiem 17. **(CH)** Dorzální pohled na stádium 18 s vyznačenými místy řezů. **(I-K)** Frontální řezy stádiem 18. Hroty šipek označují hranici, kde dochází k vyzdvihnutí neurální tkáně nad okolní povrch. Toto vyzdvihnutí koresponduje s hranicí neurálního kýlu a okolní tkáně jen v nejranějších stádiích. Tečkovaná čára označuje bazální laminu. Co – cementový orgán; ch – chorda; hvězdička – lumen.



**Tabule 5:** Srovnání histologické stavby neurálních plotének u bazálních ryb. **(A)** Frontální řez bichira ve stádiu 19. Vyznačená oblast označuje pozici snímku (A'). **(A')** Detail buněčné stavby neurální ploténky bichira. **(B)** Frontální řez jesetera ve stádiu 19. Vyznačená oblast označuje pozici snímku (B'). **(B')** Detail buněčné stavby neurální ploténky jesetera. **(C)** Frontální řez kostlína ve stádiu 15. Vyznačená oblast označuje pozici snímku (C'). **(C')** Detail buněčné stavby neurální plotény kostlína. Černá tečkovaná čára označuje bazální laminu. Červená tečkovaná čára označuje hranice buněk. snímek A byl pořízen J. Štundlem.

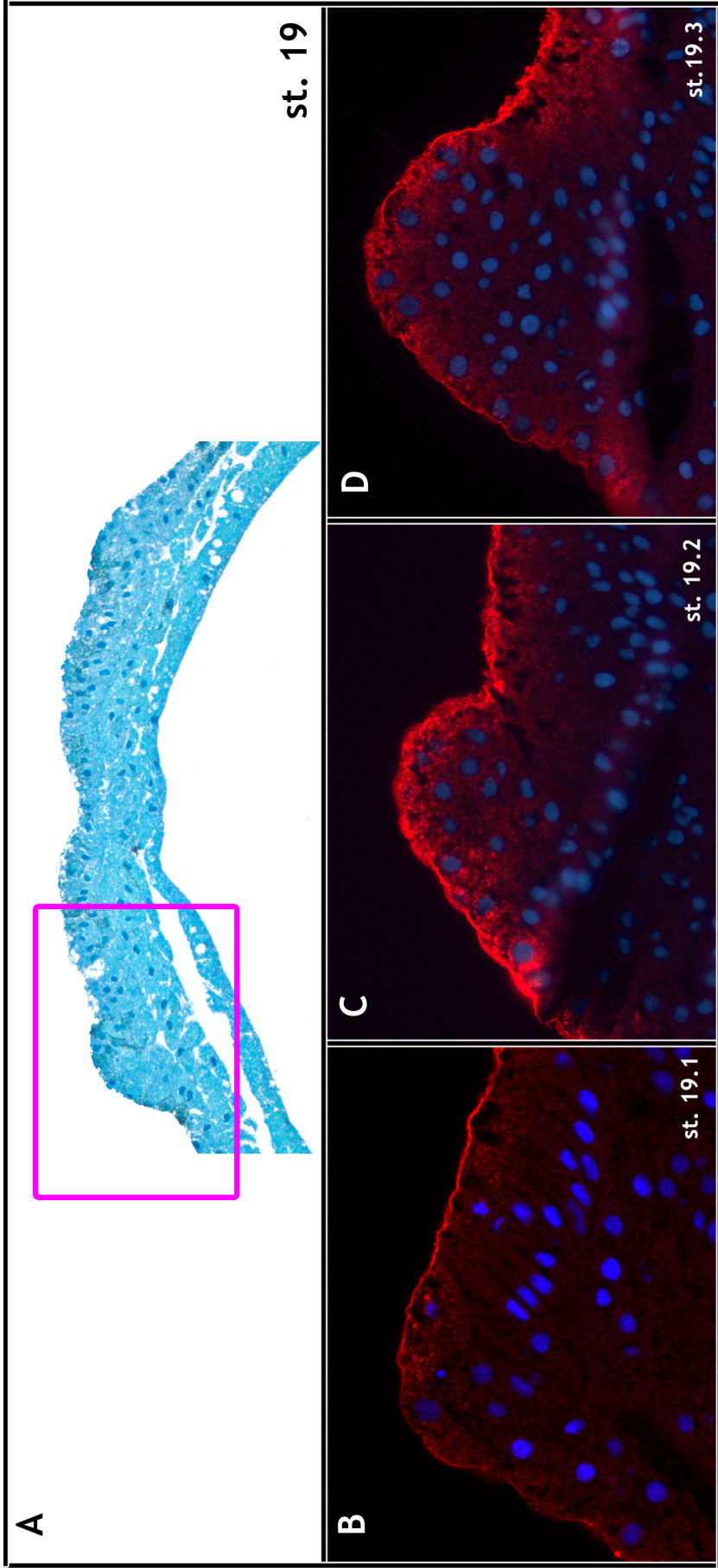


**Tabule 6:** Buněčná stavba neurálního žlábků a neurálního valu u bichira. **(A)** Frontální řez stádiem 20. Vyznačené oblasti označují pozici snímků (B) a (C). **(B)** Detail buněčné stavby neurálního žlábků. **(C)** Detail buněčné stavby neurálního valu. Tečková čára vyznačuje povrchovou vrstvu buněk. Bílá šipka – dorzolaterální místo ohybu; ch – chorda. Červeně, beta-catenin; modře, DAPI; růžově, beta-catenin v buněčných jádrech. snímek A byl pořízen J. Štundlem.

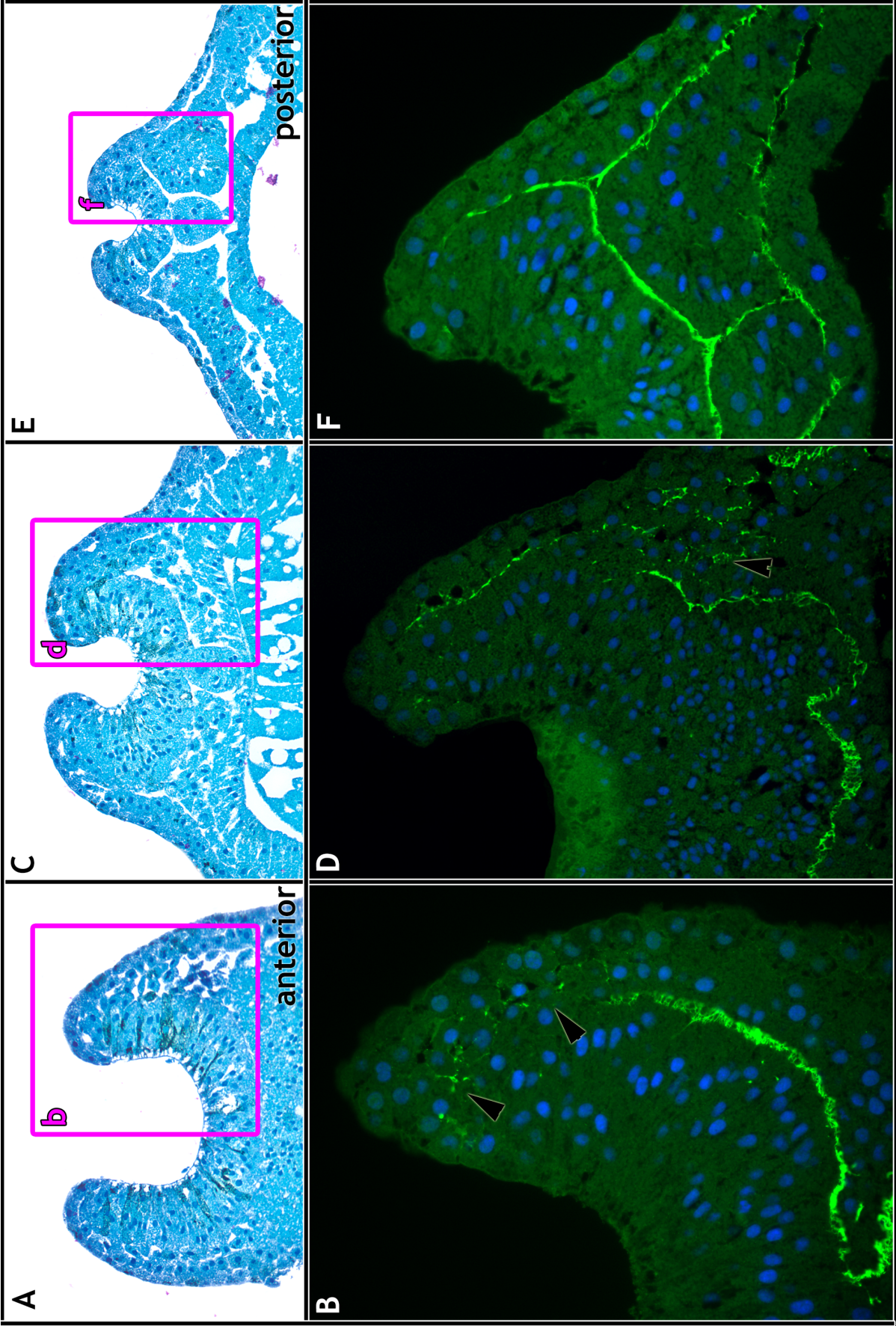




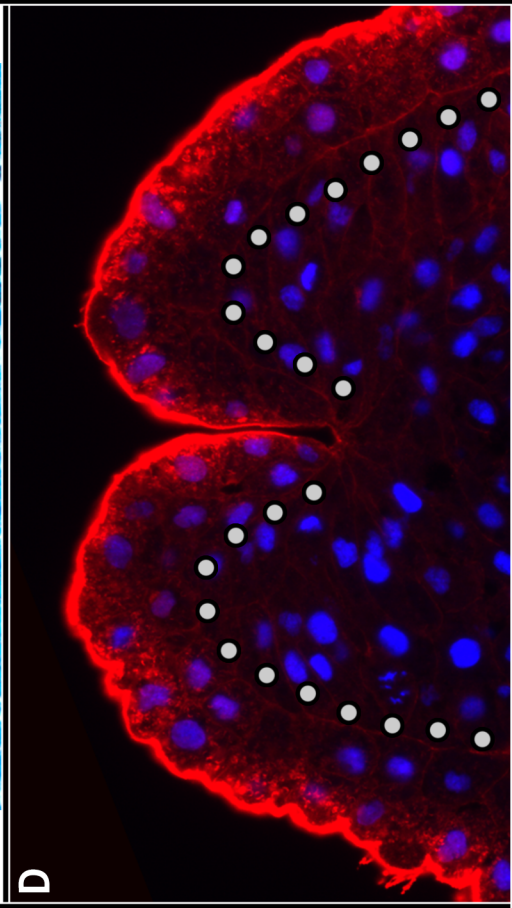
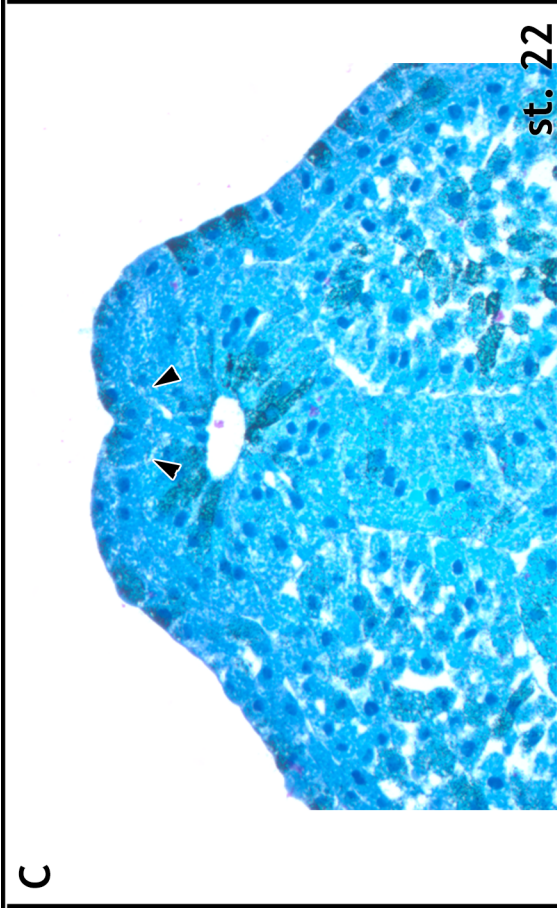
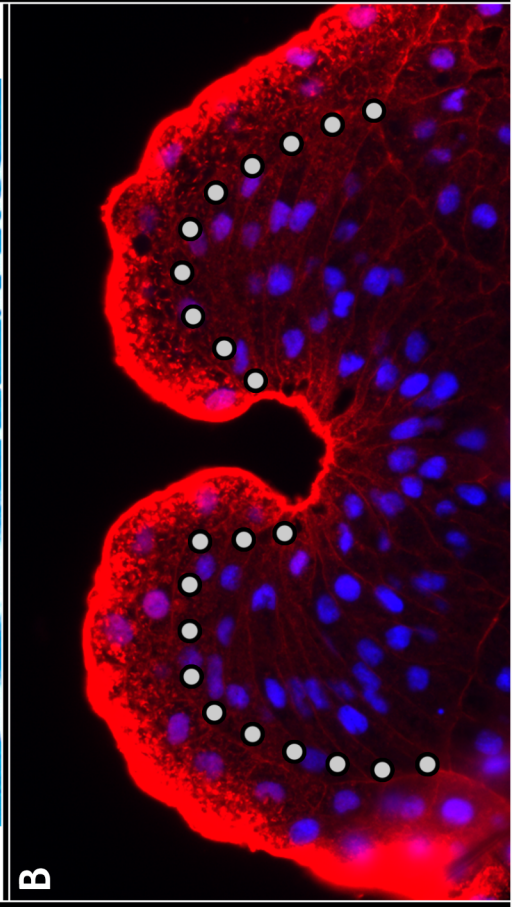
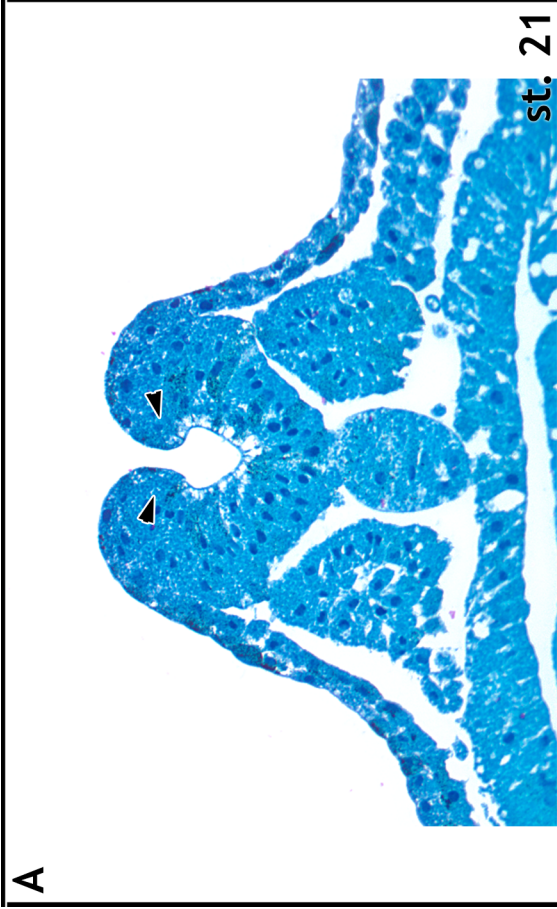
**Tabule 7:** Vznikající neurální val bichira. **(A)** Frontální řez stádiem 19. Vyznačená oblast označuje místo, kde se odehrávají děje znázorněné na substádiích 19.1, 19.2 a 19.3, kterým odpovídají snímky (B-D) respektive. **(B-D)** Detail neurálního valu zaměřený na množství buněk v dané oblasti. Červeně, beta-catenin; modře, DAPI. snímek A byl pořízen J. Štundlem.



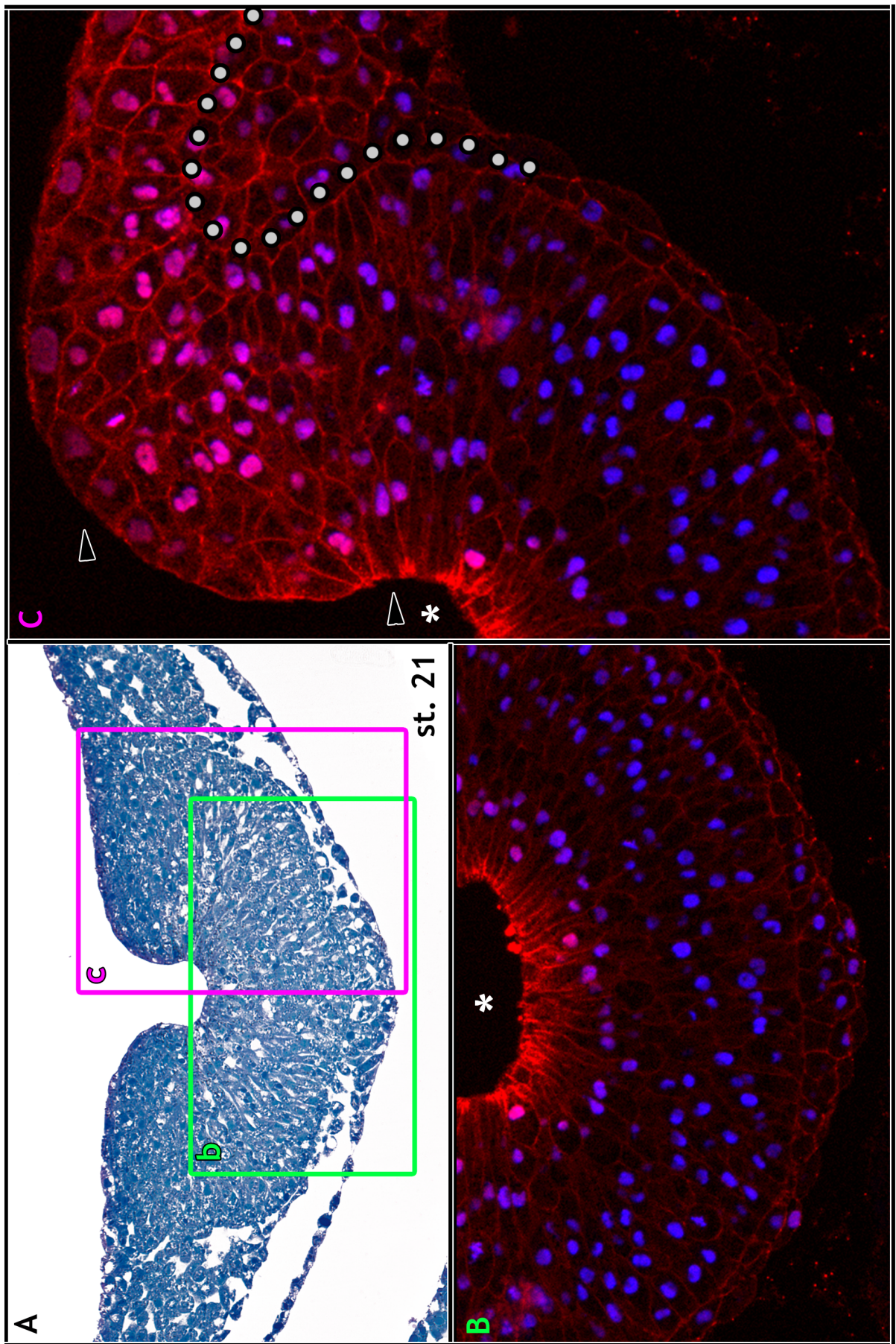
**Tabule 8:** Migrace buněk neurální lišty u bichira ve stádiu 20. **(A)** Frontální řez anteriorní oblastí embrya. Vyznačená oblast označuje pozici snímku (B). **(B)** Detail stavby bazální laminy ve vyzdviženém neurálním valu. Hroty šipek ukazují na částečné rozrušení bazální laminy. **(C)** Frontální řez oblastí hyoidního proudu. Vyznačená oblast označuje pozici snímku (D). **(D)** Detail stavby bazální laminy. Hrot šipky ukazuje na mezenchymatické buňky, které mohou být součástí hyoidního proudu. **(E)** Frontální řez trupovou oblastí. Vyznačená oblast označuje pozici snímku (F). **(F)** Detail stavby souvislé bazální laminy. Modře, DAPI; zeleně, fibronectin. snímky A, C a E byly pořízeny J. Štundlem.



**Tabule 9:** Uzavírající se neurální trubice u bichira. **(A)** Frontální řez stádiem 21. **(B)** Detail buněčné stavby neurálních valů. **(C)** Frontální řez stádiem 22. **(D)** Detail buněčné stavby neurálních valů. Tečkovaná čára značí hranici povrchové vrstvy ektodermu. Hroty šipek vyznačují místo dotyku neurálních valů. Červeně, beta-catenin; modře, DAPI. snímky A a C byly pořízeny J. Štundlem.

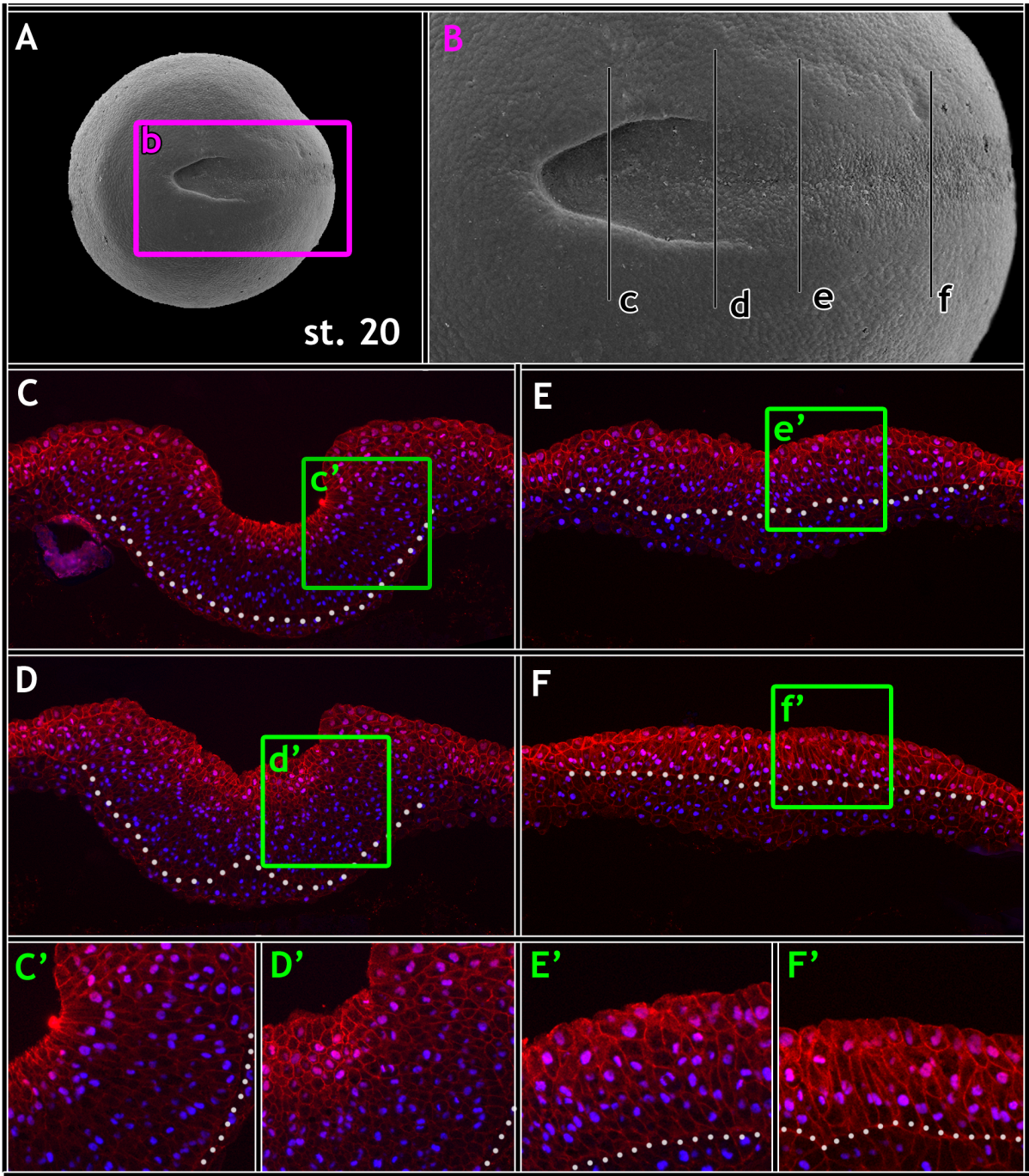


**Tabule 10:** Buněčná stavba neurálního žlábků a neurálního valu u jesetera. **(A)** Frontální řez stádiem 21. Vyznačené oblasti označují pozici snímků **(B)** a **(C)**. **(B)** Detail buněčné stavby neurálního žlábků. **(C)** Detail buněčné stavby neurálního valu. Hroty šipek označují buňky, pro které není typická EMT, ale obsahují beta-catenin v jádrech (povrchová vrstva ektodermu, buňky v kontaktu s lumen). Tečkovaná čára označuje zúžení neurální tkáně v oblasti neurálního valu. Hvězdička – budoucí lumen. Červeně, beta-catenin; modře, DAPI; růžově, beta-catenin v buněčných jádrech. snímek A byl pořízen J. Štundlem.

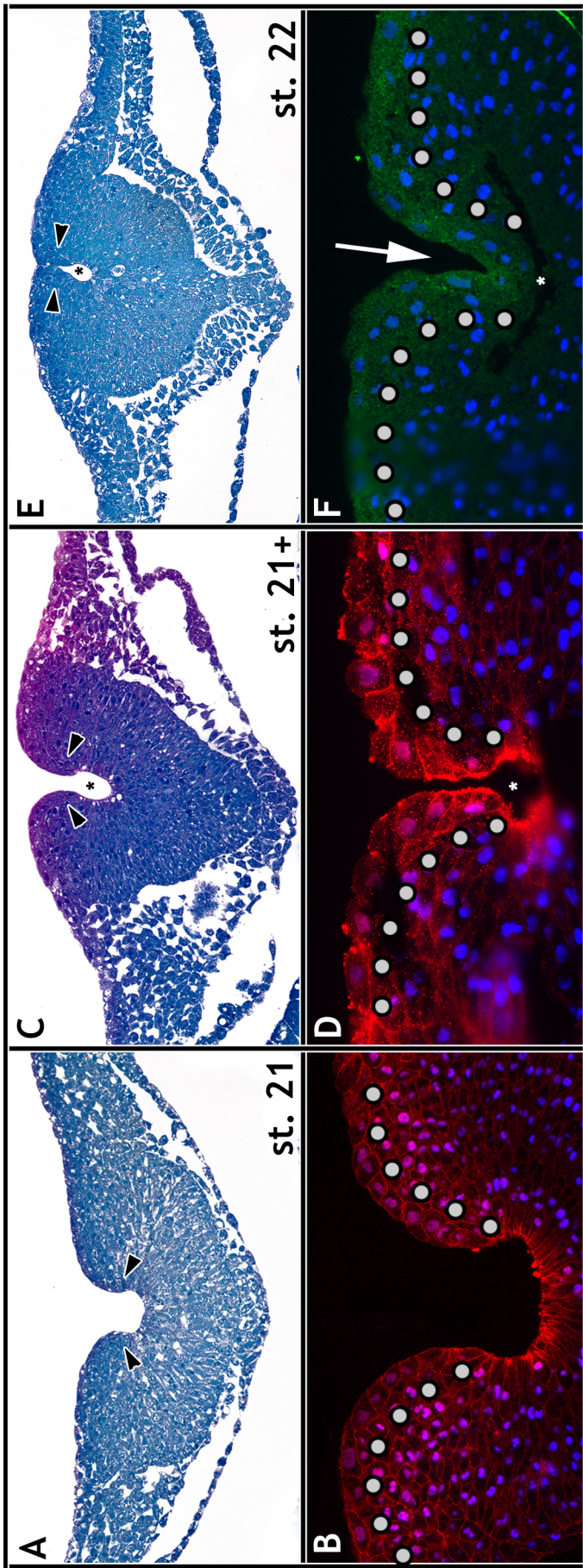




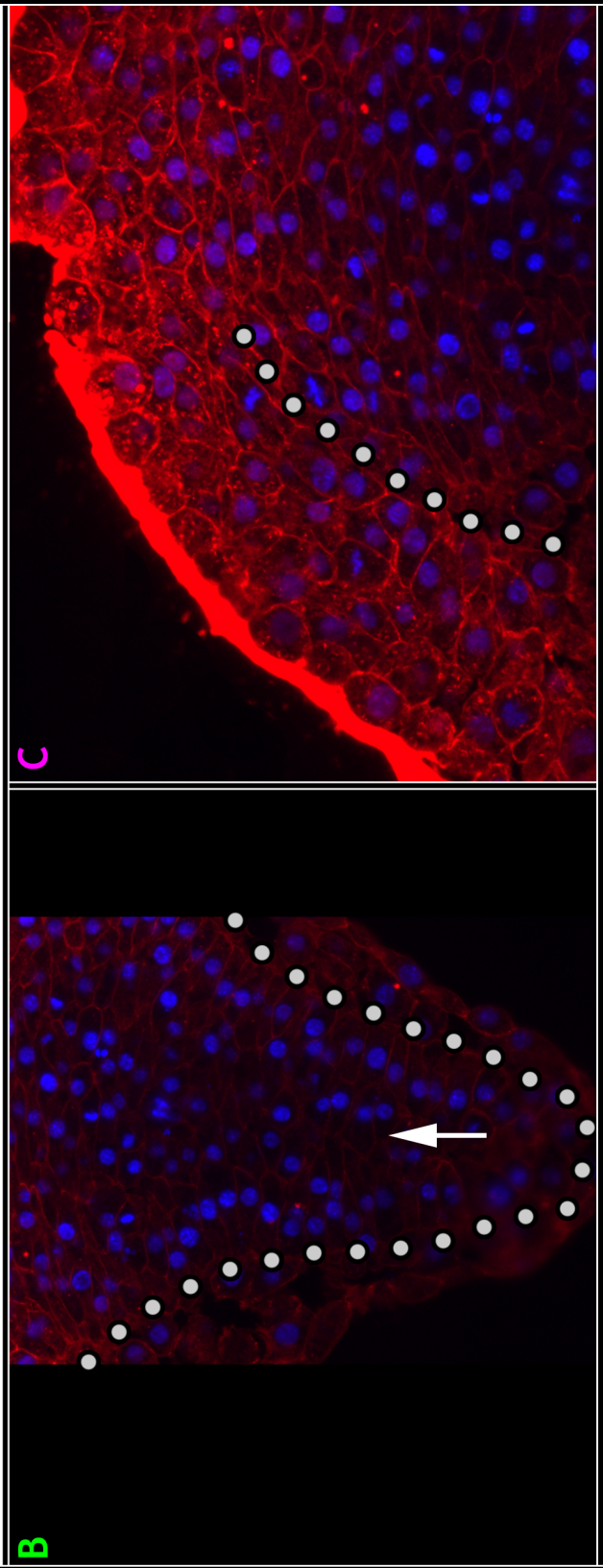
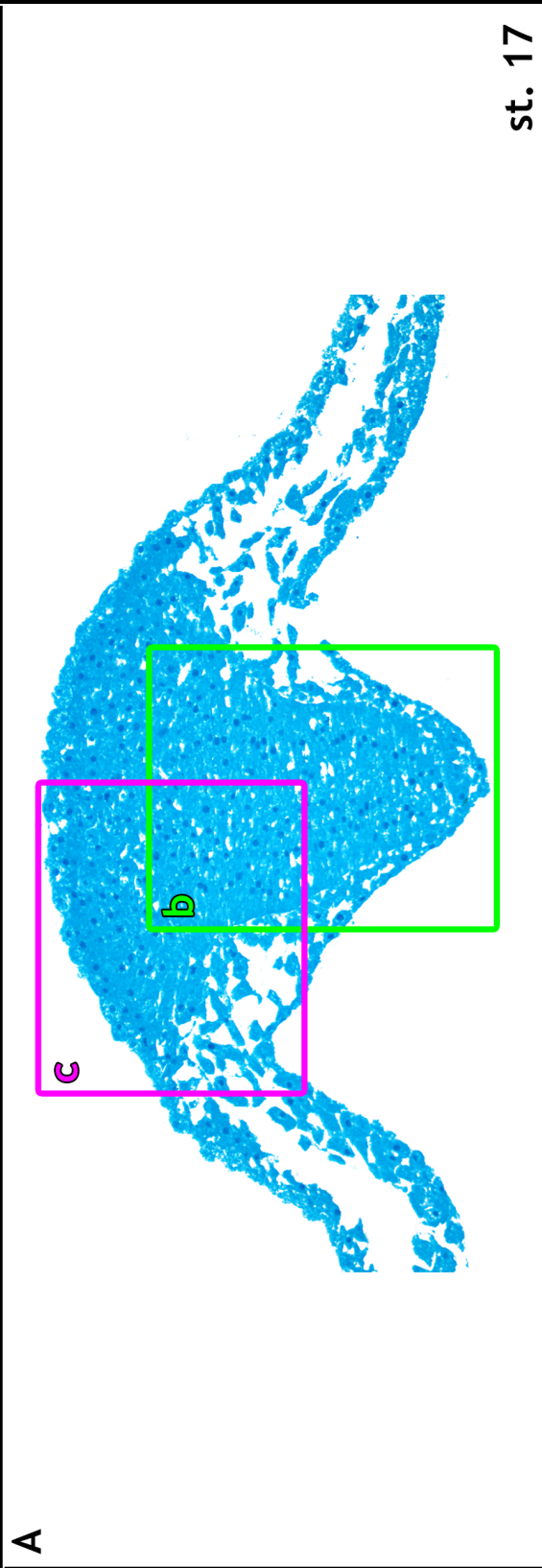
**Tabule 11:** Rozdíly v buněčné stavbě neurálního žlábků a neurální ploténky podél anteroposteriorní osy embrya jesetera ve stádiu 20. **(A)** Dorzální pohled na stádium 20. Anteriorní oblast směřuje doleva. Vyznačená oblast označuje pozici snímku (B). **(B)** Dorzální pohled na neurální žlábek a neurální ploténku u jesetera s vyznačenými místy řezů. **(C-F)** Frontální řezy neurálním žlábkem a neurální ploténkou. Vyznačené oblasti označují pozici snímků (C'-F'') respektive. **(C'-F')** Detail buněčné stavby neurálního žlábků a neurální ploténky. Tečkovaná čára označuje bazální laminu. Červeně, beta-catenin; modře, DAPI; růžově, beta-catenin v buněčných jádrech.



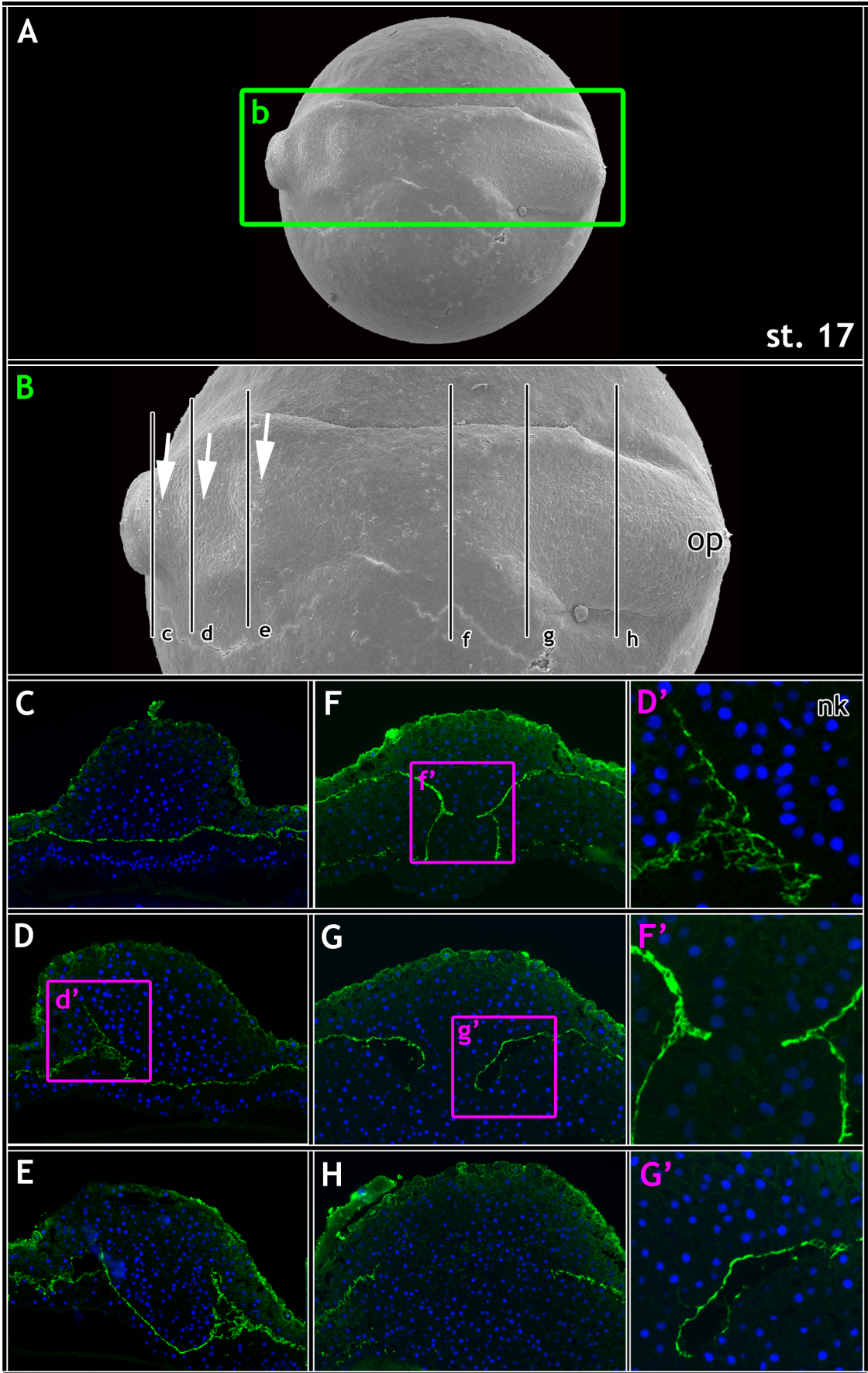
**Tabule 12:** Uzavírající se neurální trubice u jesetera. **(A)** Frontální řez anteriorní oblastí stádia 21. **(B)** Detail buněčné stavby neurálních valů. **(C)** Frontální řez anteriorní oblastí stádia 21+. **(D)** Detail buněčné stavby neurálních valů. **(E)** Frontální řez anteriorní oblastí stádia 22. **(F)** Detail buněčné stavby neurálních valů. Hroty šipek a tečkovaná čára vyznačují hranici povrchové vrstvy ektodermu. Bílá šipka – falešný neurální žlábek; hvězdička – lumen. Červeně, beta-catenin; modře, DAPI; růžově, beta-catenin v buněčných jádrech; zeleně, fibronectin. snímky A, C a E byly pořízeny J. Štundlem.



**Tabule 13:** Rozdíly v buněčné stavbě různých oblastí neurálního kýlu u kostlína ve stádiu 17+. **(A)** Frontální řez stádiem 17. Vyznačené oblasti označují pozici snímků (B) a (C). **(B)** Detail buněčné stavby ventrální oblasti neurálního kýlu. Tečkovaná čára vyznačuje bazální laminu. Bílá šipka – lateromediálně orientované buňky, které nejsou připojené k bazální lamině. **(C)** Detail buněčné stavby dorzolaterální oblasti neurálního kýlu. Tečkovaná čára označuje hranici mezi dvěma oblastmi neurálního kýlu. Červeně, beta-catenin; modře, DAPI.

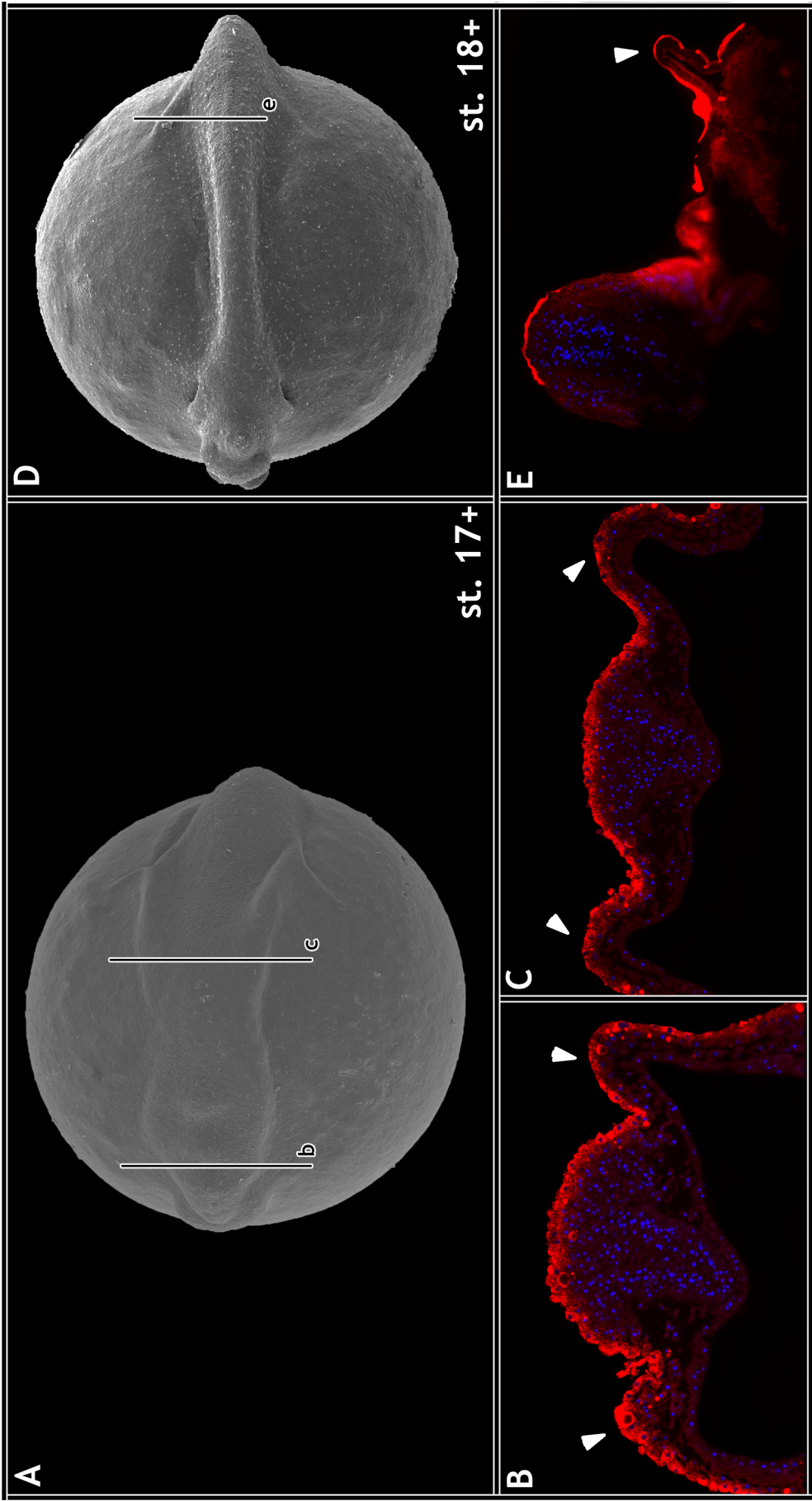


**Tabule 14:** Rozdíly v buněčné stavbě neurálního kýlu podél anteroposteriorní osy stádia 17 kostlína. **(A)** Dorzální pohled na stádium 17. Anteriorní oblast směřuje doleva. Vyznačená oblast označuje pozici snímku (B). **(B)** Dorzální pohled na oblast neurálního kýlu u kostlína s vyznačenými místy řezů. Bílé šipky značí tři mozkové váčky. **(C-F)** Frontální řezy neurálním kýlem. Vyznačené oblasti označují pozici snímků (D',F', G'). **(D', F', G')** Detail pozice bazální laminy a buněk. Nk – neurální kýů; op – ocasní pupen. Modře, DAPI; zeleně, fibronectin.

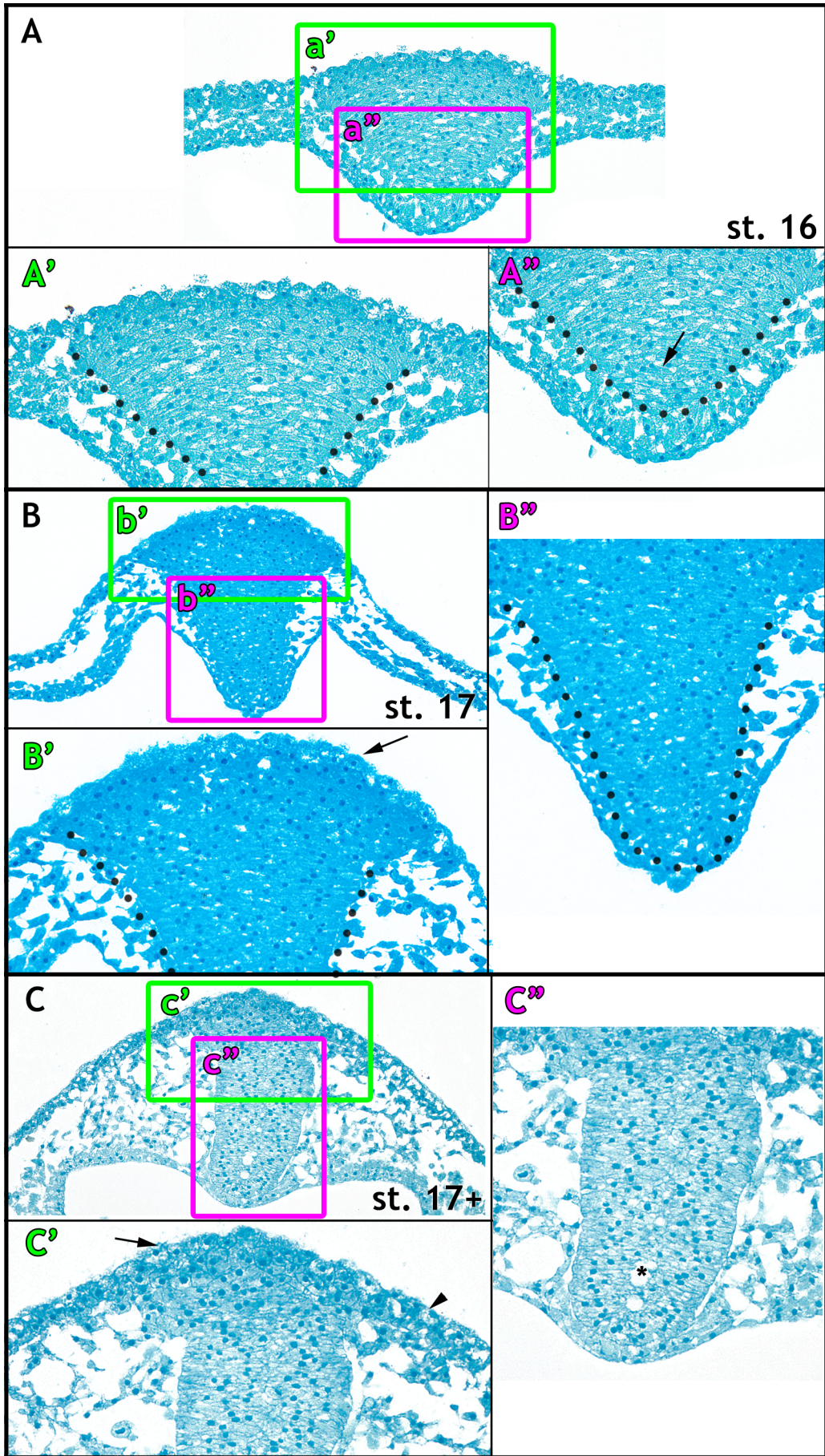




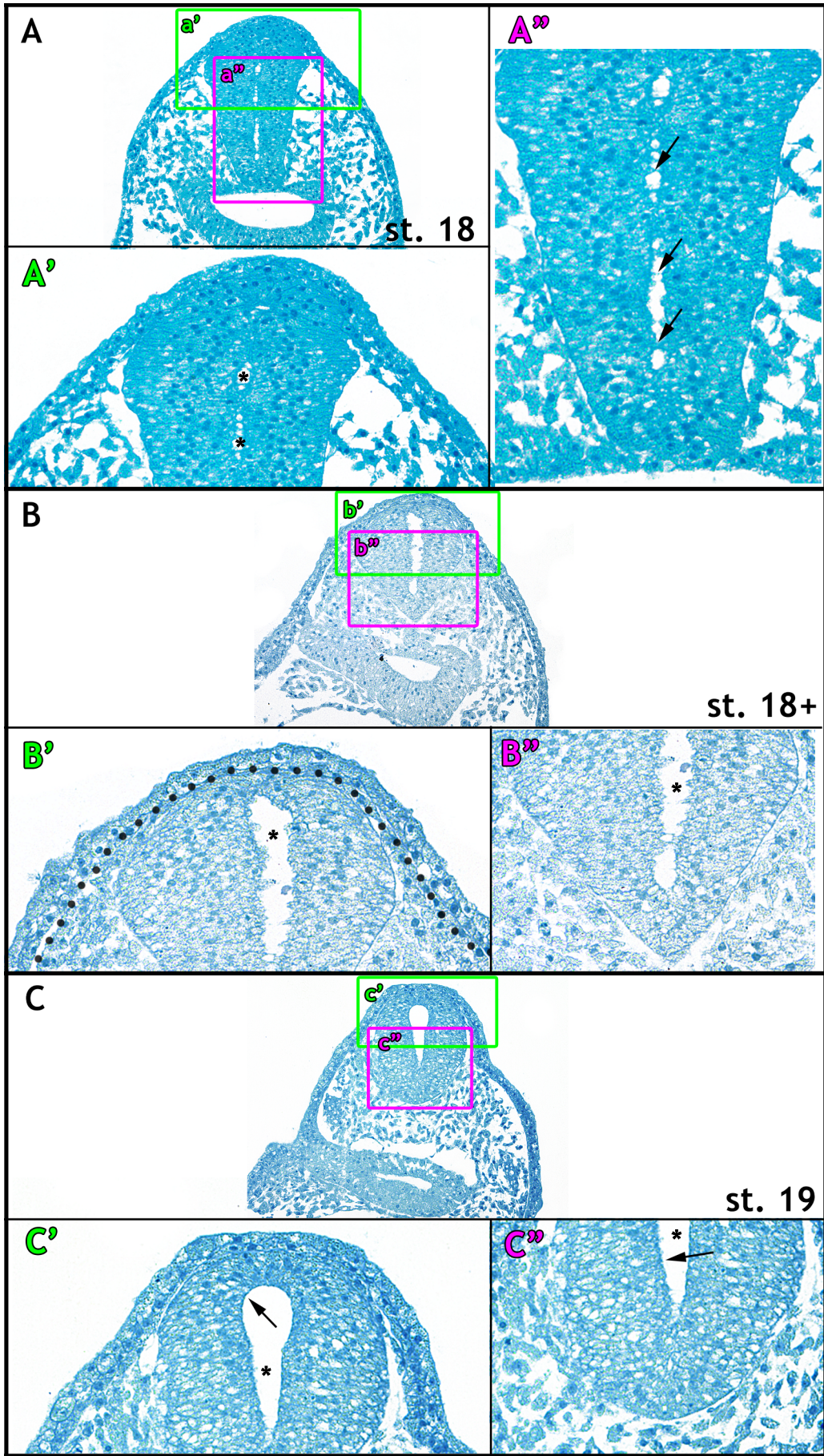
**Tabule 15:** Stavba "neurálních valů" kostlína. **(A)** Dorzální pohled na stádium 17+ s vyznačenými místy řezů. Anteriorní oblast směřuje doleva. **(B-C)** Frontální řezy ukazující dorzální výchlípky archenteronu. **(D)** Dorzální pohled na stádium 18+ s vyznačeným místem řezu. Anteriorní oblast směřuje doleva. **(E)** Frontální řez ukazující výchlípku tvořenou intermediátním mezodermem. Hroty šipek ukazují na výchlípky, které se podle vnější stavby jeví jako neurální valy.



**Tabule 16:** Morfogeneze neurálního kýlu u kostlína. **(A-C)** Frontální řezy stádiu 16-17+. Vyznačené oblasti označují pozici snímků (A', A''; B', B''; C', C''; respektive). **(A', A'')** Detail buněčné stavby neurálního kýlu ve stádiu 16. Šipka označuje lateromediálně orientované buňky, které nejsou připojené k bazální lamině. **(B', B'')** Detail buněčné stavby neurálního kýlu ve stádiu 17. Šipka označuje nepravidelně tvarované buňky povrchové vrstvy ektodermu. **(C', C'')** Detail buněčné stavby neurálního kýlu ve stádiu 17+. Šipka označuje nepravidelně tvarované buňky povrchové vrstvy ektodermu. Hrot šipky označuje pravidelně tvarované buňky povrchové vrstvy ektodermu. Hvězdička – lumen.



**Tabule 17:** Vznik lumen v neurálním kýlu kostlína. **(A-C)** Frontální řezy stádiu 18-19. Vyznačené oblasti označují pozici snímků (A', A''; B', B''; C', C''; respektive). **(A', A'')** Detail buněčné stavby vznikajícího lumen ve stádiu 18. Šipky označují můstky cytoplazmy. **(B', B'')** Detail buněčné stavby vznikajícího lumen ve stádiu 18+. Tečkovaná čára označuje hranici povrchové vrstvy ektodermu a neurální trubice. **(C', C'')** Detail buněčné stavby vznikajícího lumen ve stádiu 19. (C') Šipka značí epiteliální charakter buněk. (C'') Šipka značí ne zcela epiteliální charakter buněk. Hvězdička – lumen.



## 5. Diskuze

Kostnaté ryby (*Teleostei*), které tvoří většinu žijících obratlovců, jsou typické vznikem své neurální trubice skrze stádium tzv. neurálního kýlu (Schmitz et al. 1993). Tento způsob neurulace je unikátní napříč celou skupinou obratlovců, kde se jinak setkáváme s procesy neurulace typickými svinováním neurální ploténky (např. Colas et al. 2001; Shum et al. 1996). Kostnaté ryby jsou vrcholovou skupinou paprskoploutvých ryb (*Actinopterygii*), a tak bylo zajímavé prozkoumat procesy neurulace u bazálně umístěných skupin paprskoploutvých ryb. Vyjevené rozdíly mezi liniemi, ozřejmily postupné změny od svinování neurální ploténky k procesům neurulace skrze neurální kýl. Pro studii byli použiti bichir a jeseter coby zástupci bazálně oddělených skupin, a kostlín, který spolu s kaprounem (*Amia calva*) tvoří skupinu (*Holostei*). Zmínění zástupci se oddělili od kmene paprskoploutvých ryb před další celogenomovou duplikací (3R), která je typická pro skupinu kostnatých ryb (Meyer and Van de Peer 2005). Navzdory fylogenetické pozici paprskoploutvých ryb, která je jedinečná pro pochopení evoluce morfogeneze neurulace, nebylo o jejich raném embryologickém vývoji v nedávné době publikováno mnoho odborných prací. Vydané práce se pak zaměřují především na vnější popis jednotlivých embryonálních stádií. Ačkoliv jsem ve své práci vycházela především z mnou zpracovaného materiálu, pro ilustraci uvádím i zmíněnou literaturu týkající se raného vývoje bazálních paprskoploutvých ryb (např. Bemis and Grande 1992; Park et al. 2013; Long and Ballard 2001; Kunz et al. 2009).

### 5.1. První morfologické rozdíly mezi procesy neurulace

Vnější morfologie neurální ploténky během jejího vzniku je u všech tří druhů studovaných ryb značně podobná (srovnej **Tab. 1A, E, CH**). Rozdíly začnou být patrné až v pozdějších stádiích. Největší rozdíl spočívá v pozici neurální ploténky vůči okolní tkáni, kdy u bichira probíhá celá morfogeneze nad okolním žloutkem. Naproti tomu u jesetera probíhají procesy neurulace pod okolním povrchem. Neurální žlábek, který je u bichira dobře patrný a u jesetera sice stále patrný ale méně zřejmý, zcela chybí ve srovnatelném stádiu kostlína. Zde místo neurálního žlábků nacházíme masu buněk vystupující nad okolní povrch (srovnej **Tab. 1B, F, I**). Pozice nad okolním žloutkem a pod okolním žloutkem zůstává v průběhu další embryogeneze stejná u bichira a jesetera respektive, což je značný rozdíl oproti kostlínovi, kde se primordium neurální

trubice postupně vynořuje a zvedá nad okolní žloutek (srovnej **Tab. 1**).

## **5.2. Apikální konstriktce, konvergentní extenze, tlak okolních tkání a vliv žloutku coby mechanismy podílející se na procesech neurulace**

Ačkoliv vnější morfologie neurálních plotének se mezi bichirem, jeseterem a kostlínem příliš neliší, na úrovni histologických řezů jsou zřejmé rozdíly v buněčné stavbě už v takto raných stádiích (**Tab. 5**). U bichira nacházíme jednovrstevný epitel, u jesetera je epitel vícevrstevný a u kostlína je taktéž mnohvrstevná tkáň, v níž ale buňky nejsou apikobazálně orientované tak, jak je to zřejmé u předchozích dvou druhů.

Během neurulace jsou ústředními buněčnými procesy apikální konstriktce způsobená souhrou mikrotubulů a mikrofilament (Lee et al. 2007) a konvergentní extenze, při které dochází k vzájemnému posunu jednotlivých buněk v rámci tkáně (Wallingford et al. 2000).

U bichira se setkáváme se specifickými místy ohybu neurální ploténky (mediální a dorsolaterální místa ohybu), která navzájem přibližují neurální valy nápadným způsobem. Ve stádiu 20 je dokonce patrné ohnutí neurálních valů tak, že jejich vrcholky směřují k sobě, což je následně (st. 22) patrné i na tvaru lumen uzavřené neurální trubice (**Tab. 2J**). Na buněčné úrovni je skutečně možné pozorovat, že k apikální konstriktci dochází pouze u některých buněk neurální ploténky, zatímco jiné si zanechávají apikálně nezúžený tvar (**Tab. 6B, C**).

U jesetera se již se specifickými místy ohybu téměř nesetkáváme. Neurální valy jsou ve stádiu 21 v paralelní pozici a není zde ani náznak ohnutí vrcholků neurálních valů tak, jak je to zřejmé u bichira (srovnej **Tab. 3** a **Tab. 2**). Při bližším pohledu na buněčnou stavbu neurální ploténky ve stádiu 21 (**Tab. 10**) lze pozorovat apikální konstriktci u všech buněk svrchní vrstvy neurální ploténky. Na přibližování neurálních valů jesetera se podílí apikální konstriktce všech buněk svrchní vrstvy neurální ploténky.

Z histologických řezů nelze s jistotou říci, do jaké míry se na uzavírání neurální trubice u bichira a jesetera podílí konvergentní extenze. Vzhledem k tomu, že je tento proces známý u neurulačních procesů celé řady obratlovců (Wallingford et al. 2002; Ciruna et al. 2006; Colas et al. 2001), lze předpokládat, že se do jisté míry podílí také na uzavírání neurální trubice bichira a jesetera.

U kostlína není patrná žádná apikální konstriktce buněk ani na tkáňové úrovni



ani při bližším pohledu na buněčnou stavbu (**Tab. 4** a **Tab. 13**). Celý proces neurulace ale na první pohled nápadně připomíná konvergentní pohyby mezodermu, které byly popsány u drápatky (srovnej **obr. 19** a **Tab. 4**). Stejně jako v mezodermu u drápatky jsou buňky v neurálním kýlu kostlína neustále ve vzájemném kontaktu. Během morfogeneze neurálního kýlu lze pozorovat dorzálním směrem se zvětšující množství buněk přisedlých k laterální bazální lamině (**Tab. 16**). Hypoteticky lze předpokládat, že jsou buňky v neurálním kýlu schopné se přesouvat, a tak dosáhnout bazální laminy, kde dochází k jejich „připoutání“. Takto „připoutané“ buňky by stále vykazovaly tendenci k pohybu, který by byl „připoutáním“ omezen pouze mediálním směrem. Tímto procesem by docházelo k pokračujícímu vmezeřování buněk, jejich „připoutání“ k laterální bazální lamině a tím i k zúžování neurálního kýlu. Popsaný proces by také vysvětlil, proč uspořádání buněk podél bazální laminy začíná ve ventrální oblasti neurálního kýlu (**Tab. 16C**). Zde je totiž jen malý prostor, v rámci kterého by se buňky mohly pohybovat, a tak by s větší pravděpodobností došlo k jejich „připoutání“ k bazální lamině rychleji než v dorzální oblasti, která je laterálně široká. Pro získání důkazů pro popsanou teorii by bylo potřeba použít metodu sledování osudu živých buněk (fate-mapping), kdy dochází k injekci buněčné značky (např. Dil) do neurálního kýlu v rané fázi (st. 16). To umožní sledovat následnou morfogenezi tkáně.

Apikální konstrikce a konvergentní extenze jsou síly, které působí v rámci neurální trubice na její uzavírání. V souvislosti s uzavíráním neurální trubice jsou ale v literatuře zmiňovány také vnější síly (Colas and Schoenwolf 2001; Alvarez and Schoenwolf 1992). K neurální trubici přiléhají laterálně povrchová vrstva ektodermu a mezoderm, ventrálně potom endoderm. U kuřete bylo ukázáno, že na uzavírání neurální trubice má největší vliv právě povrchová vrstva ektodermu tím, že tlačí na neurální valy a tím je vzájemně přibližuje (Alvarez and Schoenwolf 1992). Lze se domnívat, že přiléhající tkáně budou do určité míry tlačit na neurální ploténku či na neurální kýl a tím se podílet na morfogenezi neurální tkáně u všech tří zástupců bazálních ryb. U kostlína se nabízí v úvahu dorzolaterální populace neurálního kýlu, která by mohla vyvíjet tlak na dorzomediální oblast a tím ji zúžovat (**Tab. 13**).

Tlak přiléhajících tkání na neurální valy, respektive neurální kýl, je velmi pravděpodobně propojen s vlivem dalších tkání přítomných během raného vývoje. V embryogenezi obratlovců existují popsány systémy, jejichž rozdílnost je vysvětlována

rozdílným množstvím žloutku v embryu. Mezi ně se řadí procesy gastrulace (Arendt and Nübler-Jung 1999) nebo vznik primárních úst (Soukup et al. 2012). V linii paprskoploutvých ryb dochází ke zvětšení množství žloutku a s tím i ke změně rýhování vajíčka a následné gastrulace (Cooper and Virta 2007). V tomto kontextu se zvětšování množství žloutku u paprskoploutvých ryb jeví jako nepochybný vliv, který stojí nejen za změnami v procesech gastrulace (Cooper and Virta 2007), ale který také může mít přímý vliv na změnu morfogeneze procesů neurulace. U bichira, který má nejméně žloutku, se neurální valy zvedají výrazně nad okolní žloutek a celý proces neurulace probíhá nad okolní tkání (**Tab. 1A-D** a **Tab. 2**). Větší množství žloutku u jesetera je pak doprovázeno menšími neurálními valy (**Tab. 1E-H** a **Tab. 3**). Důvodem, proč neurální valy u jesetera nejsou schopné se vyzdvihnout nad okolní povrch, by mohlo být právě větší množství žloutku, které zmenšuje prostor a zároveň zvyšuje tlak v rámci embrya. To následně zabraňuje ohýbání neurální destičky v míře, která je patrná u bichira. U kostlína je množství žloutku největší, a tak je možné argumentovat, že minimální prostor a velký tlak v embryu zcela znemožnily vyzdvih neurálních valů. Následkem toho byl vyvinut alternativní mechanismus vytvoření neurální trubice, tj. neurulace přes neurální kýl, který nevyžaduje prostor pro ohýbání neurální destičky (**Tab. 1CH-K** a **Tab. 4**). Bylo by velmi zajímavé najít způsob, který by umožnil vliv žloutku na procesy neurulace otestovat.

### **5.3. Rozdíly v procesech neurulace podél anteroposteriorní osy**

Vnější morfologie bichira nasvědčuje tomu, že se charakter jeho neurální ploténky podél anteroposteriorní osy příliš nemění. Dobře definovatelné neurální valy jsou zřejmé od raného stádia (st. 19) až po uzavření neurální trubice (st. 22) (**Tab. 1**). Jejich vyzdvižená pozice nad okolním žloutkem je také pozorovatelná ve všech analyzovaných stádiích na všech jejich úrovních AP osy (**Tab. 2**).

U jesetera lze však na úrovni histologických řezů JB-4 pozorovat rozdíly v charakteru neurální ploténky podél AP osy (**Tab. 3**). Zatímco anteriorní oblast neurální ploténky ve stádiu 21 vystupuje nad okolní povrch, posteriorní oblast zůstává v linii s okolní tkání. Ve stádiu 19 se setkáváme s neurální ploténkou v úrovni okolní tkáně podél celé její AP osy. Pro změny odehrávající se mezi stádiem 19 a 21, tak bylo analyzováno stádium 20 (**Tab. 11**). Ukázalo se, že charakter neurální ploténky ve stádiu

20 vykazuje velké rozdíly. Anteriorní oblast je typická symetrickým neurálním žlábkem tvořeným buňkami s apikální konstrikcí. Naproti tomu dále posteriorně je patrný nepravidelný neurální žlábek s nepravidelně uspořádanými i rozmanitě tvarovanými buňkami. Pozorované změny a přítomnost beta-cateninu v jádrech naznačují, že by zde mohlo docházet k dočasnému opuštění striktně epiteliálního charakteru (**Tab. 11**). Takto vzniklé částečně mezenchymatické buňky by pak umožnily přestavbu tkáně. Jedním z procesů, které by v tomto kontextu přicházely v úvahu, je konvergentní extenze.

U kostlína dochází během neurulace (st. 14-17) k postupnému vynořování celého primordia neurální trubice (**Tab. 1**). Z vnější morfologie je patrné, že celý proces probíhá uniformně podle celé AP osy. Vzhledem k neobvyklosti procesu neurulace u kostlína byla provedena podrobnější analýza (**Tab. 14**). Z ní je patrné, že anteriorní a posteriorní oblast si jsou podobné neuspořádaným charakterem buněk, který se mění v neurální kýl ve střední části embrya (střední myšleno na AP ose). Neurulace přes neurální kýl je typická také pro dánío, kde je tento proces přirovnáván k sekundární neurulaci v oblasti ocasního pupenu (Nikolopoulou et al. 2017). Oblast ocasního pupenu, která se nachází v posteriorní části těla obratlovců (Schoenwolf et al. 1979; Schoenwolf et al. 1984; Nakao et al. 1984), se však u kostlína liší od anteriorní oblasti ve způsobu neurulace. Zatímco primordium neurální trubice je v anteriorní oblasti ventrálně ohraničené bazální laminou, v posteriorní oblasti jsou buňky budoucí neurální trubice smíšené s buňkami, které se budou podílet na vzniku chordy a somitů. Na druhé straně je třeba říci, že rozdíly v buněčné organizaci anteriorní a posteriorní oblasti kostlína (popř. dánía) nejsou zdaleka tak velké jako rozdíly mezi anteriorní a posteriorní oblastí kuřete nebo myši, se kterými byla neurulace přes neurální kýl srovnávána. V tomto kontextu je pochopitelné, že neurulace přes neurální kýl je stále přirovnávána k sekundární neurulaci.

#### **5.4. Vznik lumen u jednotlivých zástupců bazálních ryb**

Uzavírání neurální trubice a s tím spojený vznik lumen je jednou z hlavních oblastí zájmu vědců vzhledem k častým novorozeneckým vadám spojených se špatným průběhem tohoto procesu (Wallingford et al. 2013). Jako modelový druh pro neurulaci u obratlovců jsou často popisovány procesy neurulace u kuřete (Gilbert, 2014). Zde

dochází při uzavírání neurální trubice k vytváření lumen tím, že zároveň splývají neurální ektoderm a epidermis, které jsou oba součástí vrcholků neurálních valů (Colas and Schoenwolf 2001).

U bichira (**Tab. 9**) a jesetera (**Tab. 12**) se uzavírání neurální trubice poněkud liší od výše popsaného schématu. U obou druhů dochází nejprve ke splynutí povrchové vrstvy ektodermu, která se morfologicky liší od neurální tkáně. Ke splynutí neurální tkáně dochází až sekundárně, nikoliv tedy současně se splývání epidermis tak, jak je to popsáno výše. Stejně jako ve výše popsaném schématu dochází ke vzniku lumen během uzavírání neurální trubice.

U kostlína se však setkáváme se zcela specifickým způsobem vzniku lumen. Stejně jako u sekundární neurulace, i zde vzniká lumen až dodatečně. U sekundární neurulace probíhá proces kavitace, kdy vzniká několik malých kavit v různých oblastech neurální tkáně a ty následně splývají (**obr. 14**). Na rozdíl od toho u kostlína vzniká lumen vždy v mediální ose neurálního kýlu mezi dvěma řadami buněk (**Tab. 17**). Vzhledem k tomu, že proces neurulace kostlína nápadně připomíná proces neurulace u kostnaté ryby dánia pruhovaného, lze předpokládat, že i vznik lumen bude do značné míry podobný (srovnej **obr. 23** a **Tab. 17**). V tom případě by i v neurálním kýlu kostlína docházelo k dělení buněk, kdy mateřská buňka zůstává přichycena k laterální bazální lamině, zatímco se dceřiná buňka přichytí k protiležící bazální lamině. Výsledná apikobazální polarizace dceřiné buňky je tak vůči mateřské buňce zrcadlově symetrická. Mezi apikálními konci obou buněk se ustanovuje lumen. Dělení buněk napříč neurálním kýlem by odpovídala přítomnost můstků cytoplazmy, které jsou patrné na histologických řezech kostlína (**Tab. 17A**). Lumen u kostlína se vždy začíná otvírat ve ventrální oblasti neurálního kýlu. To může být způsobeno buď procesem konvergentní extenze (popsáno výše) nebo proces může být indukovaný mezodermem (chorda, somity), který je znám svými indukčními aktivitami v určování dorzoventrální organizace neurální trubice (Wilson and Maden 2005).

## **5.5. Evoluční přechod od svinování neurální trubice k neurálnímu kýlu**

Vzhledem k tomu, že neurální trubice vzniká svinováním neurální ploténky napříč celou skupinou obratlovců a také u bazálně oddělených zástupců paprskoploutvých ryb (bichir, jeseter), lze konstatovat, že neurulace skrz neurální kýl je druhotně odvozený

způsob, který vznikl právě z původního svinování. Zároveň lze říct, že neurulace skrz neurální kýl není výlučnou vlastností kostnatých ryb, ale sdílí ji i s kostlínem (viz tato práce) a kaprounem (Jaroszewska and Dabrowski 2009).

Společným znakem všech tří zástupců je přítomnost neurální ploténky v nejranějších fázích neurulace. Vnější morfologie je u všech tří zástupců značně podobná, ale histologické řezy změnu od jednovrstevného epitelu (bichir) k mnohvrstevné tkáni (jeseter, kostlín), která je doprovázena ztrátou epiteliálního charakteru buněk (kostlín). Následné ohýbání neurální ploténky je u bichira a jesetera doprovázena apikální konstrikcí buněk. Ta se u zmíněných zástupců liší v lokalizaci. U bichira se tvoří specifická místa ohybu, naproti tomu jeseter je typický uniformní apikální konstrikcí všech buněk svrchní vrstvy neurální ploténky. Ztráta epiteliálního charakteru buněk u kostlína pravděpodobně souvisí také se ztrátou apikální konstriktce coby procesu podílejícího se na formování neurální trubice. Je možné, že její funkci přibližování laterálních okrajů primordia neurální trubice tak převzal proces konvergentní extenze, který se běžně podílí na procesech neurulace u jiných organismů a je předpokládán také u bichira a jesetera. Dalším procesem, který může mít vliv na uzavírání neurální trubice u všech zástupců bazálních ryb, je tlak tkání, jež bezprostředně přiléhají k neurální trubici. Tento proces může být ovlivněn zvětšujícím se množstvím žloutku v linii paprskoploutvých ryb.

Rozdíly mezi procesy neurulace jsou tak možná spojené s rozdílnou mírou vlivu apikální konstriktce, konvergentní extenze, tlaku přiléhajících tkání a různým množstvím žloutku. U kostlína, kde se zcela vytratil epiteliální charakter, není možné, aby probíhala apikální konstriktce. Zároveň je zde v porovnání s bichirem a jeseterem největší množství žloutku. Konvergentní extenze a tlak přiléhajících tkání tak mohly společně zvýšit svoje působení, což zcela změnilo stavbu a způsob procesů neurulace. V souvislosti s těmito změnami muselo u kostlína (a také kostnatých ryb) dojít ke vzniku unikátního mechanismu otvírání lumen, aby byl zachován výsledný tvar procesu neurulace, tj. neurální trubice.

## 6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo analyzovat způsoby neurulace u bichira (*Polypterus senegalus*), jesetera (*Acipenser ruthenus*) a kostlína (*Atractosteus tropicus*). Tito zástupci paprskoploutvých ryb (*Actinopterygii*) jsou díky své fylogenetické pozici výbornými modely pro studium evolučního přechodu neurální trubice do podoby tzv. neurální kýly, který je zcela unikátní pro korunovou skupinu paprskoploutvých ryb, kostnaté ryby (*Teleostei*).

U všech tří druhů byly studovány procesy neurulace na úrovni vnější morfologie za pomoci skenovacího elektronového mikroskopu, na tkáňové úrovni pomocí histologických řezů JB-4 pryskyřice a na buněčné úrovni pomocí imunohistochemie. Byla tak shromážděna unikátní data o stavbě neurální ploténky v nejranější fázi procesu neurulace, o jejím následném ohýbání za vzniku neurálního žlábků a neurálních valů (u bichira a jesetera) nebo o její morfogenezi za vzniku neurálního kýlu (u kostlína) a o závěrečném ustanovení lumen neurální trubice.

Tato práce vyjevila, že se první rozdíly v procesech neurulace objevují již ve dvouhově rozdílné stavbě neurální ploténky. U bichira a jesetera lze při ohýbání neurální ploténky pozorovat apikální konstrikci buněk, která se u obou druhů liší oblastí výskytu. Nic takového nebylo pozorováno u kostlína, a tak byly diskutovány jiné další alternativy (konkrétně tlak přiléhajících tkání, konvergentní extenze a zvětšující se množství žloutku v linii paprskoploutvých ryb), které se mohou podílet na vzniku neurální trubice kostlína. Vnější morfologie neurální ploténky bichira nenaznačuje žádné změny podél AP osy. U jesetera se však neurální ploténka podél AP osy mění, a tak byla provedena podrobná analýza buněčné stavby neurální ploténky. Neobvyklý způsob neurulace u kostlína byl také dokumentován na buněčné stavbě podél AP osy neurální ploténky.

Výsledky mé diplomové práce jsou první srovnávací analýzou procesů neurulace u tří zástupců bazálních ryb. Ti přispěli díky své fylogenetické pozici k prvním náhledům problematiky týkající se evoluční změny procesu neurulace, kdy z pleziomorfního charakteru skrze svinování neurální ploténky vznikl nový typ neurulace skrze neurální kýly typický pro skupinu *Neopterygii* (tj. *Holostei* a *Teleostei*).

Další výzkum by bylo vhodné zaměřit na buněčné procesy a transformace, které stojí za svinováním neurální ploténky u bichira a jesetera a za ustanovením neurálního

kýlu kostlína. Následně by bylo zajímavé porovnávat způsoby neurulace na úrovni těchto buněčných transformací. K tomu by pomohly techniky jako např. injekce DiI umožňující pozorovat přesuny buněk v rámci tkáně (fate mapping) nebo *in situ* hybridizace, která by umožnila definovat různé časové a místní změny genové exprese buněk podílejících se na morfogenezi neurální trubice u jednotlivých druhů. To by pomohlo přesněji definovat postupné změny, které se odehrály při evolučním přechodu ze svinování na neurální kýl. Dále by bylo také zajímavé prozkoumat vztah anteriorní oblasti neurální trubice a vznikajících úst u zástupců bazálních paprskoploutvých ryb. Především bichira lze díky přítomnosti larvy v jeho životním cyklu považovat za podobného ancestrálním obratlovcům, a tak by studie vzniku jeho úst mohla přispět k ucelení hypotézy o příbuznosti úst a anteriorního neuroporu (Veeman et al. 2010).

Na závěr lze konstatovat, že analýzy vnější morfologie a histologie neurul zástupců bazálních paprskoploutvých ryb nabídly zajímavý a informativní vhled do vzniku unikátního embryologického procesu, se kterým se setkáváme u největší skupiny žijících obratlovců.

## 7. Literární zdroje

- 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): 234–56.
- Alvarez, I S, Schoenwolf, G C.** 1992. Expansion of surface epithelium provides the major extrinsic force for bending of the neural plate. *The Journal of Experimental Zoology* 261 (3): 340–48.
- Araya, C, Ward, L C, Girdler, G C, Miranda, M.** 2016. Coordinating cell and tissue behavior during zebrafish neural tube morphogenesis. *Developmental Dynamics* 245 (3): 197–208.
- Arenas-Mena, C, Cameron, A R, Davidson, E H.** 2000. Spatial expression of hox cluster genes in the ontogeny of a sea urchin. *Development* 127 (21): 4631–43.
- Arendt, D, Nübler-Jung, K.** 1997. Dorsal or ventral: similarities in fate maps and gastrulation patterns in annelids, arthropods and chordates. *Mechanisms of Development* 61 (1–2): 7–21.
- Arendt, D, Nünler-Jung, K.** 1999. Rearranging gastrulation in the name of yolk: evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs. *Mechanisms of Development* 81 (1–2): 3–22.
- Bemis, W E, Grande, L.** 1992. Development of the actinopterygian head. I. External development and staging of the paddlefish *Polyodon spathula*. *Journal of morphology* 213 (1):47–83.
- Burnside, B.** 1971. Microtubules and microfilaments in newt neuralation. *Developmental Biology* 26 (3): 416–41.
- Ciruna, B, Jenny, A, Lee, D, Mlodzik, M, Schier, A F.** 2006. Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation. *Nature* 439 (7073): 220–24.
- Colas, J F, Schoenwolf, G C.** 2001. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics* 221 (2): 117–45.
- Cooper, M, Virta, V C.** 2007. Evolution of gastrulation in the ray-finned (Actinopterygian) fishes. *Journal of Experimental Zoology* 308: 591–608.
- Davidson, L, Keller, R.** 1999. Neural tube closure in xenopus laevis involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development* 126 (20): 4547–56.
- Dehal, P, Boore, J L.** 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biology* 3 (10): e314.
- Delsman, H C.** 1922. *The Ancestry of Vertebrates*. Amersfoort: Valkoff and Co.
- Delsuc, F, Brinkmann, H, Chourrout, D, Philippe, H.** 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439 (7079): 965–68.
- Dettlaff, T A, Ginsburg, A S, Schmalhausen, O I.** 1993. *Sturgeon Fishes, Developmental Biology and Aquaculture*. Berlin: Springer-Verlag.
- Diedhiou, S, Bartsch, P.** 2009. Staging of the early development of *Polypterus (Cladistia: Actinopterygii)*. In *Development of Non-Teleost Fishes*. Edited by Kunz, Y W, Luer, C A, and Kapoor, B G. New Hampshire: Science Publishers.
- Gaisler, J, Zima, J.** 2007. *Zoologie Obratlovců*. Second edition. Praha: Academia.
- Gee, H.** 2007. *Before the Backbone: Views on the Origin of the Vertebrates*. Springer Science & Business Media.
- Geldmacher-Voss, B, Reugels, A M,**



- Pauls, S, Campos-Ortega, J A.** 2003. A 90-degree rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells. *Development* 130 (16): 3767–80.
- Gilbert, S F.** 2014. *Developmental Biology*. Edited by Azelie Aquadro. 10th edition, Andrew D. Sinauer.
- Hashimoto, H, Robin, F B, Sherrard, K M, Munro, E M.** 2015. Sequential contraction and exchange of apical junctions drives zippering and neural tube closure in a simple chordate. *Developmental Cell* 32 (2): 241–55.
- Hogan, B L M, Kolodziej, P A.** 2002. Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nature Reviews. Genetics* 3 (7): 513–23.
- Holland, L Z.** 2015. The origin and evolution of chordate nervous systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 370 (1684): 20150048–20150048.
- Holland, L Z, Holland, N D.** 2001. Evolution of neural crest and placodes: amphioxus as a model for the ancestral vertebrate *Journal of Anatomy* 199 (Pt 1-2): 85–98.
- Holland, N D., Panganiban, G., Henyey, E L, Holland, L Z.** 1996. Sequence and developmental expression of amphidll, an amphioxus distal-less gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest. *Development* 122 (9): 2911–20.
- Holland, P W, Garcia-Fernández, J, Williams, N A, Sidow, A.** 1994. Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Development. Supplement*, 125–33.
- Jaroszewska, M, Dabrowski, K.** 2009. Early ontogeny of *Semionotiformes* and *Amiiformes (Neopterygii: Actinopterygii)*. In *Development of Non-Teleost Fishes*. Edited by Kunz, Y W, Luer, C A, and Kapoor, B G. New Hampshire: Science Publishers.
- Kaji, T, Reimer, J D, Morov, A R, Kuratani, S, Yasui, K.** 2016. Amphioxus mouth after dorso-ventral inversion. *Zoological Letters* 2: 2.
- Kalluri, R, Weinberg, R.** 2009. Review series the basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–28.
- Kaltenbach, S L, Yu, J, Holland, N D.** 2009. The origin and migration of the earliest-developing sensory neurons in the peripheral nervous system of amphioxus. *Evolution & Development* 11 (2): 142–51.
- Kaul-Strehlow, S, Urata, M, Minokawa, T, Stach, T, Wanninger, A.** 2015. Neurogenesis in directly and indirectly developing enteropneusts: of nets and cords. *Organisms, Diversity & Evolution* 15 (2): 405–22.
- Kaul, S, Stach, T.** 2010. Ontogeny of the collar cord: neurulation in the hemichordate saccoglossus kowalevskii. *Journal of Morphology* 271 (10): 1240–59.
- Keller, R, Davidson, L, Edlund, A, Elul, T, Ezin, M, Shook, D, Skoglund, P.** 2000. Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 355 (1399): 897–922.
- Kerosuo, L, Bronner-Fraser, M.** 2012. What is bad in cancer is good in the embryo: importance of emt in neural crest development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23 (3): 320–32.
- Kim, K, Daniels, K J, Hay, E D.** 1998. Tissue-specific expression of  $\beta$ -catenin in normal mesenchyme and uveal melanomas and its effect on invasiveness. *Experimental Cell Research* 245 (1): 79–90.

- Kim, K, Lu, Z, Hay, E D.** 2002. Direct evidence for a role of beta-catenin/lef-1 signaling pathway in induction of emt. *Cell Biology International* 26 (5): 463–76.
- Kunz, Y W, Luer, C A, Kapoor, B G (Eds.).** 2009. Development of non-teleost fishes. New Hampshire: Science Publishers.
- Lee, C, Scherr, H M, Wallingford, J B.** 2007. Shroom family proteins regulate gamma-tubulin distribution and microtubule architecture during epithelial cell shape change. *Development* 134 (7): 1431–41.
- Long, W L, Ballard, W W.** 2001. Normal embryonic stages of the longnose gar, *lepisosteus osseus*. *BMC Developmental Biology* 1: 6.
- Lowe, C J, Clarke, D N, Medeiros, D M, Rokhsar, D S, Gerhart, J.** 2015. The deuterostome context of chordate origins. *Nature* 520 (7548). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 456–65.
- Lowe, C J, Terasaki, M, Wu, Michael, Freeman, R M, Runft, L, Kwan, K, Haigo, S, Aronowicz, J, Lander, E, Gruber, C, Smith, M, Kirschner, M, Gerhart, J.** 2006. Dorsoventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution. *PLoS Biology* 4 (9): e291.
- Martín-Durán, J M, Pang, K, Børve, A, Lê, H S, Furu, A, Cannon, J T, Jondelius, U, Hejnol, A.** 2018. Convergent evolution of bilaterian nerve cords. *Nature* 553 (7686): 45–50.
- McShane, S G, Molè, M A, Savery, D, Greene, N D, Tam, P P, Copp, A J.** 2015. Cellular basis of neuroepithelial bending during mouse spinal neural tube closure. *Developmental Biology* 404 (2). Elsevier: 113–24.
- Meyer, A, Van de Peer, Y.** 2005. From 2r to 3r: evidence for a fish-specific genome duplication (fsgd). *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 27 (9): 937–45.
- Miyamoto, N, Nakajima, Y, Wada, H, Saito, Y.** 2010. Development of the nervous system in the acorn worm *balanoglossus simodensis*: insights into nervous system evolution. *Evolution & Development* 12 (4): 416–24.
- Miyamoto, N, Wada, H.** 2013. Hemichordate neurulation and the origin of the neural tube. *Nature Communications* 4: 2713.
- Miyayama, Y, Fujimoto, T.** 1977. Fine morphological study of neural tube formation in the teleost, *Oryzias latipes*. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 54 (2–3): 97–120.
- Morris, S C, Caron, J B.** 2014. A primitive fish from the cambrian of north america. *Nature* 512 (7515): 419–22.
- Nakao, T, Ishizawa, A.** 1984. Light- and electron-microscopic observations of the tail bud of the larval lamprey (*Lampetra japonica*), with special reference to neural tube formation. *The American Journal of Anatomy* 170 (1): 55–71.
- Nicol, D, Meinertzhagen, I A.** 1988a. Development of the central nervous system of the larva of the ascidian, *Ciona intestinalis* l. i. the early lineages of the neural plate. *Developmental Biology* 130 (2): 721–36.
- Nicol, D, Meinertzhagen, I A.** 1988b. Development of the central nervous system of the larva of the ascidian, *Ciona intestinalis* l. ii. neural plate morphogenesis and cell lineages during neurulation. *Developmental Biology* 130 (2): 737–66.
- Nielsen, C.** 1999. Origin of the chordate central nervous system - and the origin of chordates. *Development Genes and Evolution* 209 (3): 198–205.

- Nikolopoulou, E, Galea, G L, Rolo, A, Greene, N D, Copp, A J.** 2017. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development* 144 (4): 552–66.
- Nishimura, T, Honda, H, Takeichi, M.** 2012. Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure. *Cell* 149 (5): 1084–97.
- O’Shea, K S.** 1987. Differential deposition of basement membrane components during formation of the caudal neural tube in the mouse embryo. *Development* 99 (4): 509–19.
- Park, C, Sang, Y L, Dong, S K, Yoon, K N.** 2013. Embryonic development of siberian sturgeon *Acipenser baerii* under hatchery conditions: an image guide with embryological descriptions. *Fisheries and aquatic sciences* 16 (1): 15-23.
- Pasini, A, Amiel, A, Rothbacher, U, Roure, A, Lemaire, P, Darras, S.** 2006. Formation of the ascidian epidermal sensory neurons: insights into the origin of the chordate peripheral nervous system. *PLoS Biology* 4 (7): e225.
- Philippe, H, Lartillot, N, Brinkmann, H.** 2005. Multigene analyses of bilaterian animals corroborate the monophyly of ecdysozoa, lophotrochozoa, and protostomia. *Molecular Biology and Evolution* 22 (5): 1246–53.
- Putnam, N H, Butts, T, Ferrier, D E, Furlong, R F, Hellsten, U, Kawashima, T, Robinson-Rechavi, M, ... Rokhsar, D S.** 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453 (7198): 1064–71.
- Pyrgaki, C, Trainor, P, Hadjantonakis, A K, Niswander, L.** 2010. Dynamic imaging of mammalian neural tube closure. *Developmental Biology* 344 (2): 941–47.
- Satoh, N, Tagawa, K, Lowe, C J, Yu, J, Kawashima, T, Takahashi, H, Ogasawara, M, Kirschner, M, Hisata, K, Su, Y, Gerhart, J.** 2014. On a possible evolutionary link of the stomochord of hemichordates to pharyngeal organs of chordates. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 52 (12): 925–34.
- Shih, J, Keller, R.** 1992. Patterns of cell motility in the organizer and dorsal mesoderm of xenopus laevis. *Development* 116 (4): 915–30.
- Shum, S, Copp, J.** 1996. Regional differences in morphogenesis of the neuroepithelium suggest multiple mechanisms of spinal neurulation in the mouse. *Anatomy and Embryology* 194 (1): 65–73.
- Schmitz, B, Papan, C, Campos-Ortega, J A.** 1993. Neurulation in the anterior trunk region of the zebrafish brachydanio rerio. *Roux’s Archives of Developmental Biology* 202 (5): 250–59.
- Schoenwolf, G C.** 1979. Histological and ultrastructural observations of tail bud formation in the chick embryo. *The Anatomical Record* 193 (1): 131–47.
- Schoenwolf, G C.** 1984. Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *The American Journal of Anatomy* 169 (4): 361–76.
- Schoenwolf, G C, Delongo, J.** 1980. Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. *American Journal of Anatomy* 158 (1): 43–63.
- Schoenwolf, G C, Franks, M V.** 1984. Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate. *Developmental Biology* 105 (2): 257–72.
- Schoenwolf, G C, Powers, M L.** 1987. Shaping of the chick neuroepithelium during primary and secondary neurulation: role of cell elongation. *The Anatomical Record* 218 (2): 182–95.

- Schoenwolf, G C, Smith, J L.** 1990. Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development* 109 (2): 243–70.
- Smith, J L., Schoenwolf, G C.** 1997. Neurulation: coming to closure. *Trends in Neurosciences* 20 (11): 510–17.
- Soukup, V, Horáček, I, Černý, R.** 2012. Development and evolution of vertebrate primary mouth. *Journal of Anatomy* 222 (1): 79–99.
- Spear, P C, Erickson, C A.** 2012. Apical movement during interkinetic nuclear migration is a two-step process. *Developmental Biology* 370 (1): 33–41.
- Štundl, J.** 2013. Srovnání migrace a morfogeneze neurální lišty u evolučně důležitých zástupců paprskoploutvých ryb s cílem charakterizovat vývojové zdroje kraniofaciální diverzity. Charles University.
- Tawk, M, Araya, C, Lyons, D A, Reugels, A M, Girdler, Ge C, Bayley, P R, Hyde, D R, Tada, M, Clarke, J D.** 2007. A mirror-symmetric cell division that orchestrates neuroepithelial morphogenesis. *Nature* 446 (7137): 797–800.
- 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): 138–49.
- Wallingford, J B, Fraser, S E, Harland, R M.** 2002. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Developmental Cell* 2 (6): 695–706.
- Wallingford, J B, Niswander, L A, Shaw, G M, Finnell, R H.** 2013. The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. *Science* 339 (6123): 1222002.
- Wallingford, J B, Rowning, B A, Vogeli, K M, Rothbacher, U, Fraser, S E, Harland, R M.** 2000. Dishevelled controls cell polarity during xenopus gastrulation. *Nature* 405 (6782): 81–85.
- Wilson, L, Maden, M.** 2005. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology* 282 (1): 1–13.
- Ybot-Gonzalez, P, Copp, A J.** 1999. Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 215 (3): 273–83.
- Yue, J, Yu, J, Putnam, N H, Holland, L Z.** 2014. The transcriptome of an amphioxus, *Asymmetron lucayanum*, from the bahamas: a window into chordate evolution. *Genome Biology and Evolution* 6 (10): 2681–96.