

PIERWOTNE LINIE KOMÓRKOWE W ZARODKU MYSZY – ŹRÓDŁO ZARODKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

THE PRIMITIVE CELL LINEAGES OF THE MOUSE EMBRYO –
SOURCE OF EMBRYONAL STEM CELLS

Aneta SUWIŃSKA, Anna LENKIEWICZ

Zakład Embriologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: W momencie implantacji zarodek myszy zwany blastocystą zbudowany jest z trzech typów komórek o odmiennym potencjale rozwojowym i funkcji. Powstają one w wyniku dwóch rund różnicowania. W ich trakcie dochodzi do oddzielenia pierwotnej ektodermy – grupy komórek pluripotentnych, będących prekursorami ciała zarodka, a *in vitro* zdolnych do wykształcenia zarodkowych komórek macierzystych, od linii komórek pozazarodkowych (trofektodermy i pierwotnej endodermy) biorących udział w tworzeniu łożyska i błon płodowych, a w hodowli *in vitro* tworzących specyficzne dla tych linii komórki macierzyste. W niniejszej pracy opisano klasyczne i współczesne modele powstawania pierwotnych linii komórkowych w zarodku myszy oraz przedstawiono molekularną i komórkową regulację tych procesów. Omówiono rolę czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w wyodrębnianie tych struktur w blastocyście oraz utrzymywanie trzech różnych typów komórek macierzystych, które można z nich uzyskać w hodowli *in vitro*.

Słowa kluczowe: blastocysta, linie komórkowe, węzeł zarodkowy, trofektoderma, epiblast, hipoblast, komórki macierzyste, Oct4, Cdx2, Nanog, Gata4/6.

Summary: During implantation the mouse embryo called blastocyst is comprised of three cell types with differing developmental potential and function. These cell lineages are specified during two successive rounds of differentiation. They lead to setting apart a group of pluripotent cells, progenitors for the future body capable to give rise to embryonic stem cells *in vitro*, from the extraembryonic lineages (trophectoderm and primitive endoderm) that take part in formation of the placenta and foetal membranes and give rise to lineage-specific stem cells during *in vitro* culture. Here, we review classic and contemporary models of primary cell lineages arising during development and perform molecular and cellular regulation of these processes. We describe the role of transcription factors involved in blastocyst structures formation and maintenance of three distinct stem cell types, that can be isolated from them *in vitro*.

Key words: blastocyst, cell lineages, inner cell mass, trophoctoderm, epiblast, hypoblast, stem cells, Oct4, Cdx2, Nanog, Gata4/6.

1. WSTĘP

Od momentu, kiedy w latach 80. XX w. po raz pierwszy wyizolowano zarodkowe komórki macierzyste, stały się one przedmiotem ogromnego zainteresowania i wielkich nadziei. Chcąc odpowiedzieć na pytanie, skąd wywodzą się te komórki i czy istnieje zależność między ich pochodzeniem a unikalnymi właściwościami, jakimi dysponują, należałoby sięgnąć do źródła komórek macierzystych, czyli do przedimplantacyjnego zarodka myszy zwanego blastocystą. Z zarodka w tym stadium można *in vitro* wyprowadzić trzy typy komórek macierzystych: właściwe macierzyste komórki zarodkowe – ES (ang. *embryonic stem cells*), macierzyste komórki trofoblastyczne – TS (ang. *trophoblast stem cells*) oraz macierzyste komórki pierwotnej endodermy – XEN (ang. *extraembryonic endoderm stem cells*). Wszystkie trzy rodzaje komórek macierzystych można uzyskać z odmiennych linii komórkowych budujących blastocystę myszy. W trakcie normalnego rozwoju tylko jedna z tych linii – epiblast (pierwotna ektoderma) utworzy struktury zarodkowe. W hodowli *in vitro* może być ona również źródłem komórek ES. Pozostałe dwie linie komórkowe różnicują w struktury pozazarodkowe, niezbędne dla rozwoju zarodka w macicy. Hodując komórki trofoblastu (trofektodermy) w ściśle określonych warunkach można uzyskać linie komórek TS, natomiast hipoblast (pierwotna endoderma) może być źródłem komórek XEN. Zrozumienie, w jaki sposób w trakcie rozwoju dochodzi do wyodrębnienia pierwotnych linii komórkowych mogących stanowić źródło komórek macierzystych, może pomóc w poznaniu mechanizmów molekularnych umożliwiających tym komórkom zdolność do samoodnawiania się oraz różnicowania w różne typy komórek. Niniejszy artykuł ma na celu przybliżenie obecnego stanu wiedzy na temat molekularnej regulacji procesu różnicowania się pierwotnych linii komórkowych blastocysty.

2. FORMOWANIE DWÓCH NAJWCZEŚNIEJSZYCH LINII KOMÓRKOWYCH W BLASTOCYŚCIE: TROFEKTODERMY I WĘZŁA ZARODKOWEGO

Po zapłodnieniu zarodek myszy przechodzi etap zwany bruzdkowaniem. Ulega wówczas podziałom mitotycznym, w wyniku których powstają komórki zwane blastomerami. Do stadium 8-komórkowego blastomery nie różnią się od siebie morfologicznie, nie są spolaryzowane i nie podlegają żadnej istotnej specyfikacji odnośnie ich przyszłych losów. W tym stadium zarodek przechodzi proces kompaktacji. W jej trakcie blastomery zaczynają tak ściśle do siebie przylegać, że przyżyciowo trudno jest zauważyć granice między nimi. Dochodzi wtedy także do polaryzacji blastomerów, której towarzyszy zmiana lokalizacji kilku charakterystycznych białek. W części szczytowej komórki (kontaktującej się ze środowiskiem zewnętrznym) pojawiają się kompleksy białek Par3, Par6 (ang. *partitioning defective*) oraz

atypowej kinazy białkowej C – aPKC (ang. *atypical protein kinase C*). W części spodnio-bocznej (kontaktującej się tylko z innymi komórkami) lokalizują się białka, takie jak E-kadheryna oraz Par1 [19]. W efekcie tej polaryzacji, po czwartym podziale bruzdkowania zarodek 16-komórkowy budują dwa typy komórek: spolaryzowane komórki zewnętrzne i niespolaryzowane komórki wewnętrzne, stykające się jedynie z innymi komórkami. To zróżnicowanie stanowi punkt wyjścia do wytworzenia w zarodku dwóch pierwszych linii komórkowych wykazujących odmienne właściwości, funkcje i przeznaczenie.

Czwartej dnia po zapłodnieniu zarodek zwany morułą przekształca się w stadium rozwojowe zwane blastocystą. Blastocysta jest pęcherzykiem wypełnionym płynem, zbudowanym z dwóch typów komórek. Z grupy komórek leżących wewnątrz pęcherzyka, zwanej węzłem zarodkowym blastocysty – ICM (ang. *inner cell mass*), powstaną wszystkie tkanki budujące ciało zarodka oraz większość błon płodowych. Warstwa komórek tworzących ścianę pęcherzyka nosi nazwę trofoblastu lub trofektodermi – TE (ang. *trophectoderm*). Weźmie ona udział w tworzeniu zarodkowej części łożyska i będzie odpowiedzialna za nawiązanie kontaktu z tkankami macicy podczas implantacji blastocysty. Komórki trofektodermi pokrywające węzeł zarodkowy tworzą tzw. trofoblast biegunowy, natomiast komórki otaczające jamę blastocysty noszą nazwę trofoblastu ściennego. Po implantacji komórki trofoblastu biegunowego kontynuują proliferację i przekształcają się w pozazarodkową ektodermę, z której w dalszym rozwoju powstanie zarodkowa część łożyska [39]. Utrzymywanie proliferacji komórek trofoblastu biegunowego jest zależne od sygnału płynącego z przylegającego do niego węzła zarodkowego, w który zaangażowany jest czynnik wzrostu fibroblastów 4 – FGF4 (ang. *fibroblast growth factor 4*) [12, 39]. W odróżnieniu od trofoblastu biegunowego, komórki trofoblastu ściennego po implantacji przestają się dzielić, ulegają politenizacji i przekształcają się w pierwotne komórki olbrzymie, otaczające rozwijający się zarodek.

Mechanizmy leżące u podstaw wyodrębniania się we wczesnym rozwoju myszy dwóch odmiennych grup komórek: węzła zarodkowego i trofektodermi stanowią przedmiot zainteresowania już od wielu lat. Wyniki tych badań doprowadziły do powstania dwóch głównych modeli sugerujących, w jaki sposób i w którym momencie rozwoju może dojść do ukierunkowania losu komórek i ustanowienia w embriogenezie ssaków wspomnianych linii komórkowych.

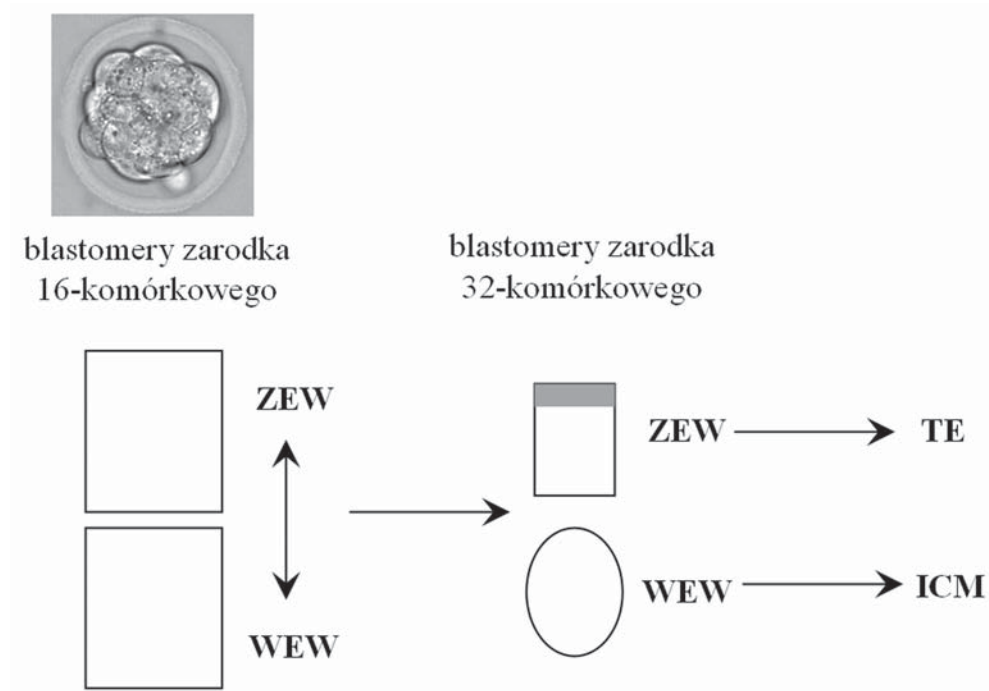
2.1. Model „*inside – outside*” („wewnątrz – zewnątrz”) oraz model „polarności komórki”

Zarodki myszy we wczesnym stadium rozwoju charakteryzują się ogromnymi zdolnościami regulacyjnymi. Już na przełomie lat 50. i 60. ubiegłego wieku Profesor Tarkowski wykazał, że gdy zniszczeniu ulegnie jeden z blastomerów w 2-komórkowym zarodku myszy, drugi będzie kontynuował rozwój i utworzy prawidłową blastocystę, która po przeszczepieniu do dróg rodnych samicy może rozwinąć się w normalną mysz [44]. Możliwe jest także uzyskanie osobników chimerowych, w skład których wchodzi komórki pochodzące z więcej niż jednego organizmu.

Agregując ze sobą bruzdkujące zarodki (np. w stadium 8-komórkowym) można uzyskać pojedynczą, prawidłowo wykształconą blastocystę, a z niej osobnika chimerowego, zbudowanego z komórek wywodzących się z obu zlepionych zarodków [45, 46].

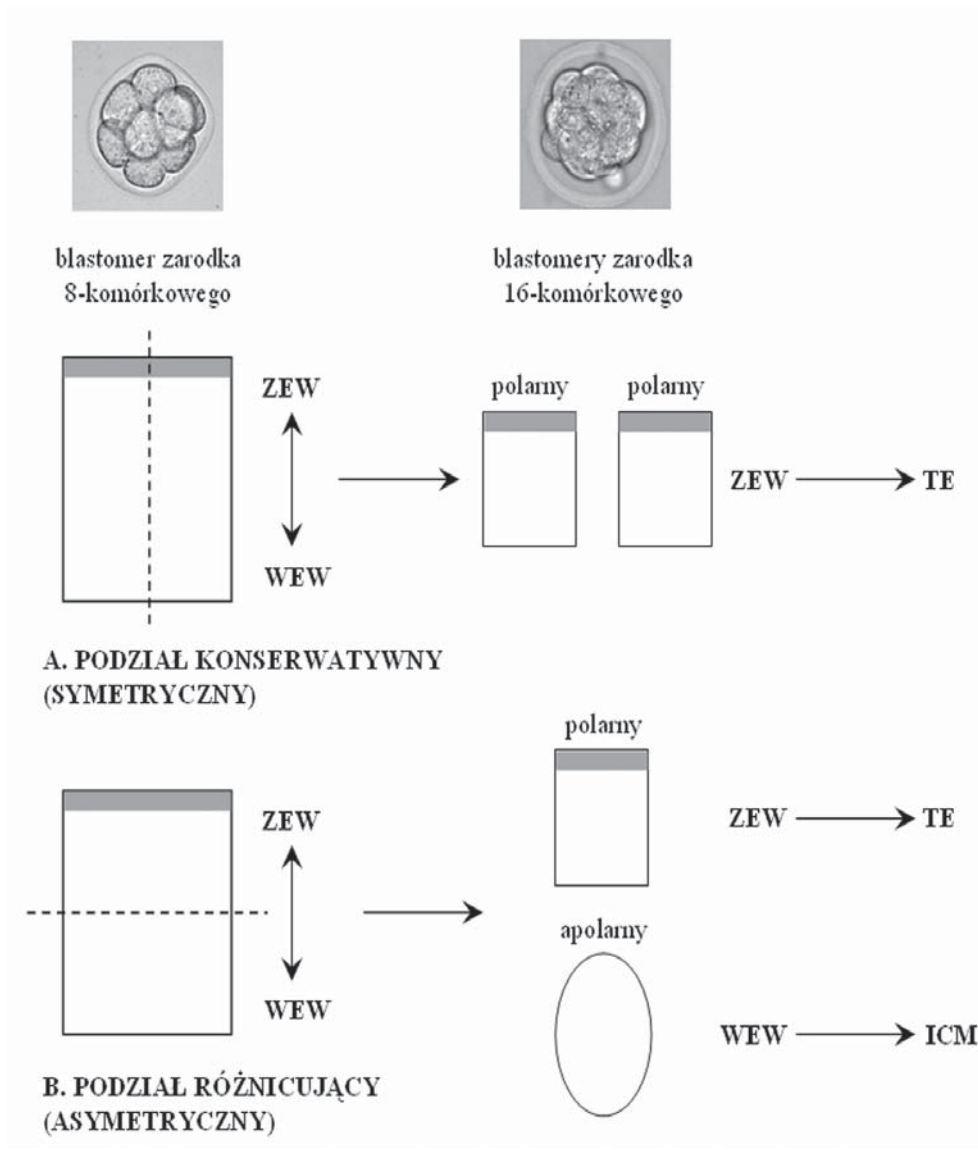
Z badań tych wynika, że co najmniej do czwartego podziału bruzdkowania, czyli do stadium 8-komórkowego, los blastomerów nie jest jeszcze ukierunkowany i wszystkie blastomery mają zdolność różnicowania się zarówno w komórki trofoblastu, jak i węzła zarodkowego. Odpowiednie decyzje dotyczące losu komórek podejmowane są prawdopodobnie w późniejszym okresie rozwoju.

Jedną z teorii sformułowaną w latach 60. ubiegłego wieku zwaną hipotezą „*inside – outside*”, czyli „wewnątrz – zewnątrz” mówi, że powstawanie struktur zarodkowych i pozazarodkowych zależy od pozycji – wewnętrznej lub zewnętrznej – zajmowanej w moruli [47]. Komórki, które w stadium 16-komórkowym znajdują się na powierzchni utworzą trofektodermę, a następnie łożysko. Natomiast te komórki, które usytuują się we wnętrzu moruli dadzą początek węzłowi zarodkowemu, z którego następnie powstaną tkanki zarodka (ryc. 1). W późniejszym czasie powstała



RYCINA 1. Powstawanie komórek prekursorowych trofektodermi i węzła zarodkowego. Hipoteza „*inside-outside*” („wewnątrz-zewnątrz”). Położenie blastomerów w 16-komórkowym zarodku myszy determinuje ich los w blastocyst. Blastomery powierzchniowe dają początek trofektodermie (TE), natomiast komórki wewnętrzne wejdą w skład węzła zarodkowego (ICM)

FIGURE 1. Formation of trophoblast and inner cell mass progenitor cells. The „*inside-outside*” hypothesis. Position of the blastomeres in the 16-cell stage mouse embryo determines their fate in the blastocyst. Surface blastomeres give rise to the trophoblast (TE) and internal cells become the inner cell mass (ICM)



RYCINA 2. Hipoteza „polarności komórki”. Po podziale konserwatywnym (symetrycznym) blastomerów 8-komórkowego zarodka powstaną dwie identyczne spolaryzowane komórki zewnętrzne, które następnie utworzą trofektodermę (TE) (A). W wyniku podziału różnicującego (asymetrycznego) dojdzie do utworzenia jednej spolaryzowanej komórki zewnętrznej, która wejdzie w skład trofektodermi (TE) oraz jednej apolarnej komórki wewnętrznej, która da początek węzłowi zarodkowemu (ICM) (B)

FIGURE 2. The „cell polarity” hypothesis. Symmetric (conservative) cleavage division of blastomeres at the 8-cell stage generates two identical polar outside cells that subsequently will form trophectoderm (TE) (A). Asymmetric cleavage division leads to the establishment of one outside polar cell that will form trophectoderm (TE) and one inside apolar cell that will give rise to the inner cell mass (ICM) (B)

jeszcze jedna teoria nazwana hipotezą „polarności komórki”. Początkowo uznawana była za alternatywną dla hipotezy „*inside – outside*”, ale najnowsze badania wskazują na to, że może ona stanowić jej uzupełnienie. Zakłada ona, że los komórek ustala się wcześniej, już w stadium 8-komórkowym. Zachodząca wówczas polaryzacja blastomerów oraz ich ułożenie pod wpływem kompaktacji wyznaczają kierunek dalszych podziałów i prowadzą do powstania komórek zewnętrznych i wewnętrznych w zarodku 16-komórkowym [54]. Podział prostopadły do powierzchni zarodka, zwany konserwatywnym lub symetrycznym, generuje dwie identyczne, spolaryzowane komórki, które dziedziczą całą informację o polarności i wchodzi w skład trofektodermy (ryc. 2A). Gdy płaszczyzna podziału jest równoległa do powierzchni zarodka, zachodzi podział zwany różnicującym, prowadzący do asymetrycznego rozdziału informacji o polarności i powstania jednej komórki zewnętrznej i jednej komórki wewnętrznej (ryc. 2B).

Potwierdzeniem tezy o późnym ukierunkowaniu losów blastomerów są ostatnie badania wskazujące, że jeszcze w stadium 16-komórkowym blastomery mają pełne potencje rozwojowe, czyli są totipotentne. Zarodki rekonstruowane wyłącznie z blastomerów wewnętrznych lub zewnętrznych pochodzących z 16-komórkowych morul mogą utworzyć prawidłowo zbudowane blastocysty, które po przeszczepieniu do dróg rodnych samicy biorczyni rozwijają się w zdrowe, płodne osobniki [43].

2.2. MODEL „PREDETERMINACJI W ROZWOJU”

Istnieje również alternatywna teoria sugerująca znacznie wcześniejszą determinację losów blastomerów. Według niej już w strukturze zapłodnionego jaja zapisana jest informacja przestrzenna, narzucająca powstającym z niej blastomerom odmienną rolę i przeznaczenie oraz decydująca o określonym programie rozwojowym zarodka [57].

Zwolennicy hipotezy, którą nazwano hipotezą „predeterminacji w rozwoju” uważają, że płaszczyzna I podziału bruzdkowania determinowana jest przez dwa punkty. Pierwszym z nich jest biegun animalny zygoty, na którym w wyniku drugiego podziału mejotycznego formowane jest II ciało kierunkowe. Drugim, nie mniej ważnym wyznacznikiem, jest miejsce wniknięcia plemnika do oocytu. Płaszczyzna podziału zygoty wyznaczona przez te dwa punkty dzieli zygotę na dwa blastomery. Blastomer dziedziczący rejon błony cytoplazmatycznej, do którego wniknął plemnik, dzieli się następnie jako pierwszy dając początek komórkom, które wchodzi w skład przede wszystkim zarodkowej części blastocysty (węzła zarodkowego i okrywającej go trofektodermy biegunowej). Potomne komórki drugiego z blastomerów tworzą natomiast część pozazarodkową, czyli warstwę trofoblastu ściennego.

Istnieje jednak szereg prac podważających powyższe obserwacje. Zakwestionowano rolę zarówno II ciała kierunkowego, jak i miejsca wniknięcia plemnika jako punktów odniesienia w ustalaniu płaszczyzny pierwszego podziału bruzdkowania [10, 14, 27]. Badania, w których znakowano blastomery i obserwowano ich rozmieszczenie w rozwijającej się blastocystie, wykazały natomiast, że komórki wywodzące się

z dwóch blastomerów stadium 2-komórkowego nie tworzą odrębnych klonów, lecz ulegają przemieszaniu i współwystępują zarówno w części zarodkowej, jak i pozazarodkowej [1, 5, 15, 52]. Sprzeczne wyniki badań sprawiają, że związek między organizacją przestrzenną zygoty a budową blastocysty nadal pozostaje kwestią wymagającą wyjaśnienia.

2.3. Mechanizmy molekularne leżące u podstaw wyodrębniania się wężła zarodkowego i trofektodermy

Kluczowymi białkami, które decydują o różnicowaniu dwóch pierwszych linii komórkowych w blastocystyce, są Oct4 i Cdx2. Produkt genu *Oct4* (ang. *octamer binding protein*) jest czynnikiem transkrypcyjnym należącym do rodziny POU. Ulega on ekspresji w jądrach wszystkich blastomerów bruzdkującego zarodka, a następnie jego ekspresja jest stopniowo ograniczana: najpierw do komórek wężła zarodkowego w blastocystyce, a następnie do warstwy pierwotnej ektodermy (epiblastu) i pierwotnych komórek płciowych [22].

Zarodki pozbawione funkcjonalnej kopii genu *Oct4* rozwijają się do stadium blastocysty, ale obumierają w okresie okołoimplantacyjnym. Hodowane *in vitro*, wyizolowane wężły zarodkowe blastocyst, których komórki pozbawione były funkcjonalnego genu kodującego Oct4, syntetyzują natomiast markery linii trofektodermalnej. Sugeruje to, że gen *Oct4* jest niezbędny do zapobiegania różnicowaniu wężła zarodkowego w kierunku trofektodermy. Istnieją doniesienia wskazujące na rolę Sall4 – białka z rodziny SPALT – jako aktywatora transkrypcji genu kodującego Oct4 [7, 56]. Wprowadzenie siRNA (ang. *small interfering RNA*) skierowanego przeciwko Sall4 do mysich zygot powoduje bowiem redukcję mRNA Sall4 oraz Oct4 oraz wzrost ekspresji markerów specyficznych dla trofektodermy w komórkach wężła zarodkowego blastocysty.

Rozwój linii trofoblastycznej w zarodku wymaga obecności czynnika transkrypcyjnego – Cdx2 (ang. *Caudal type homeodomain protein*). Według niektórych źródeł, mRNA tego białka pojawia się w stadium 8-komórkowym, a samo białko po raz pierwszy można wykryć w niektórych, położonych zewnętrznie blastomerach zarodka 16-komórkowego [42]. Inne źródła podają, że niski poziom białka Cdx2 wykrywany jest we wszystkich blastomerach 8-komórkowego zarodka. Następnie jego ekspresja ograniczana jest w komórkach wewnętrznych, a utrzymywana w komórkach powierzchniowych [6, 18, 37]. W stadium blastocysty białko Cdx2 wykrywa się wyłącznie w komórkach trofektodermy. Od momentu, gdy białko Cdx2 pojawia się w komórkach prekursorowych trofoblastu dochodzi w nich do stopniowego wygaszania aktywności genu *Oct4*, którego ekspresja zostaje ograniczona tylko do komórek wężła zarodkowego [31, 42]. Takie przestrzenne zróżnicowanie ekspresji jest prawdopodobnie wynikiem antagonizmu między białkami Oct4 i Cdx2, a wzajemne oddziaływania pomiędzy nimi wpływają na wyodrębnienie się w blastocystyce trofektodermy i wężła zarodkowego.

Brak obu alleli genu kodującego czynnik transkrypcyjny Cdx2 powoduje śmierć zarodków przed implantacją z powodu nieprawidłowego rozwoju trofektodermy [42].

Aktywność genu kodującego białko *Cdx2* nie jest zatem konieczna do powstania warstwy trofoblastu, ale do jego prawidłowego funkcjonowania. Niedawno wykazano, iż do zainicjowania ekspresji genu *Cdx2* podczas przedimplantacyjnego rozwoju myszy niezbędna jest aktywność innego czynnika transkrypcyjnego – Tead4 (ang. *TEA domain/transcription enhancer factor family*) [29, 30, 53].

Ciągle otwarta pozostaje kwestia, jakie czynniki decydują o tym, że ekspresja *Cdx2* jest ograniczona jedynie do komórek prekursorowych trofektodermy. Czy decyduje o tym pozycja komórek, ich polarność, czy też oba te czynniki? Sugeruje się, że na aktywację genu *Cdx2* może wpływać obecność kompleksu białek Par3/Par6/aPKC w szczytowej części blastomerów zarodka 8-komórkowego, co w konsekwencji prowadziłoby do zróżnicowania podziałów i wyróżnicowania linii komórkowych – TE i ICM [34, 51, 54]. Wykazano, że istnieje dodatnie sprzężenie zwrotne między polarnością komórki, a ekspresją genu *Cdx2*. Poziom białka *Cdx2* wpływa na aktywność aPKC zlokalizowanej w szczytowej części komórki i tym samym decyduje o polarności komórki. Polarność komórki z kolei ma wpływ na ekspresję *Cdx2* poprzez asymetryczne rozmieszczenie mRNA *Cdx2* w spolaryzowanych blastomerach [18]. Wyniki innej pracy przemawiają z kolei za rolą informacji pozycyjnej w regulacji ekspresji *Cdx2*. W pracy tej wykazano, że po podziale różnicującym komórki niejako rozpoznają swoją wewnętrzną lub zewnętrzną pozycję w zarodku za pośrednictwem ścieżki sygnałowej Hippo. Jednym z komponentów tej ścieżki jest białko Yap, będące koaktywatorem czynnika transkrypcyjnego Tead4. Zróżnicowanie poziomu fosforylacji białka Yap decyduje o indukcji genu *Cdx2*. Niski poziom fosforylacji białka Yap w komórkach zewnętrznych pozwala na jego jądrową akumulację, która prowadzi do aktywacji Tead i indukuje ekspresję genu *Cdx2* [30]. Nie jest również wykluczone, że powstawanie komórek prekursorowych trofektodermy i węzła zarodkowego zależy zarówno od polarności komórek, jak i ich pozycji w zarodku. Teoria ta wymaga jednak potwierdzenia [58].

Proces wyodrębniania węzła zarodkowego i trofektodermy w blastocyście jest regulowany nie tylko genetycznie, ale również epigenetycznie. Mechanizmy epigenetyczne prowadzą do zmian ekspresji genów, co nie jest związane w sposób bezpośredni ze zmianami w sekwencji nukleotydowej DNA. Należą do nich m.in. metylacja DNA oraz posttranslacyjne modyfikacje ogonów histonów, takie jak na przykład metylacja i acetylacja histonu H3, prowadzące do miejscowej reorganizacji struktury chromatyny. Wiadomo, że komórki węzła zarodkowego i trofektodermy różnią się profilem modyfikacji epigenetycznych. O losie komórek w blastocyście decyduje np. zróżnicowana metylacja DNA czynnika transkrypcyjnego *Elf5*. W węźle zarodkowym dochodzi do represji transkrypcji *Elf5* w wyniku metylacji jego promotora. Brak modyfikacji promotora tego genu w trofektodermie powoduje natomiast, że *Elf5* jest transkrypcyjnie aktywny i może indukować ekspresję genu *Cdx2*. Czynniki transkrypcyjne *Cdx2* może z kolei, na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego, aktywować gen *Elf5* [28]. W trofektodermie gen *Cdx2* jest aktywowany również poprzez modyfikacje posttranslacyjne białek histonowych: trimetylację lizyny 4 histonu H3 (H3K4me3) oraz acetylację lizyny 16 histonu H4 (H4K16). Z kolei

w węzle zarodkowym ekspresja genu *Cdx2* jest wyciszana w wyniku dimetylacji lizyny 9 histonu H3 [33]. Z powyższych badań wynika, że dzięki specyficznym modyfikacjom epigenetycznym precyzyjnie regulowana jest ekspresja genów, które są odpowiedzialne za różnicowanie komórek w blastocyście. Badania zespołu Żernickiej-Goetz wykazały, że różnice epigenetyczne mogące decydować o losie komórek występują już w blastomerach 4-komórkowego zarodka [50]. Komórki trofektodermi, wykazujące wysoki poziom białka *Cdx2*, są potomnymi tych komórek 4-komórkowego zarodka, które wykazywały najniższy poziom specyficznych modyfikacji chromatyny: dimetylacji argininy 17 i 26 histonu H3 (H3R26me2a i H3R17me2a).

3. WYODRĘBNIANIE SIĘ PIERWOTNEJ ENDODERMY I PIERWOTNEJ EKTODERMY W OBREBIE WĘZŁA ZARODKOWEGO

Piątego dnia rozwoju, tuż przed zagnieżdżeniem się zarodka myszy w macicy, następuje drugi etap różnicowania, który prowadzi do utworzenia w obrębie węzła zarodkowego dwóch odmiennych populacji komórek – pierwotnej ektodermi, zwanej inaczej epiblastem – EPI (ang. *epiblast*) oraz drugiej po trofektodermie linii pozazarodkowej – pierwotnej endodermi – PE (ang. *primitive endoderm*) zwanej inaczej hipoblastem. Pierwotna ektoderma lokalizuje się wewnątrz węzła zarodkowego, między komórkami trofoblastu biegunowego, a pierwotną endodermą. Powstałą z niej wszystkie tkanki somatyczne zarodka oraz komórki linii płciowej. Będzie ona również uczestniczyć w powstawaniu błon płodowych. Pierwotna endoderma ma postać warstwy komórek leżącej na powierzchni węzła zarodkowego zwróconej do jamy blastocysty. Warstwa ta ulega dalszemu zróżnicowaniu przekształcając się w pokrywającą węzeł zarodkowy endodermę proksymalną oraz endodermę dystalną, która wyściela pozostałą część jamy blastocysty. W dalszym rozwoju endoderma proksymalna wejdzie w skład pęcherzyka żółtkowego.

3.1. Molekularne podstawy wykształcania się epiblastu i hipoblastu

Te dwie nowopowstałe linie komórkowe różnią się profilem ekspresji genów. Markerem specyficznym dla komórek zarodkowych, a więc dla węzła zarodkowego, a później epiblastu, jest produkt genu *Nanog* [3, 26]. W komórkach ICM, które różnicują się w pierwotną endodermę dochodzi do represji genu *Nanog*, czemu towarzyszy aktywacja kilku charakterystycznych dla tej tkanki genów kodujących czynniki transkrypcyjne, m.in. *Gata4* i *Gata6* (ang. *GATA-binding protein*).

Zarodki pozbawione obu alleli genu *Nanog* tworzą prawidłowe morfologicznie blastocysty, ale formowanie pierwotnej ektodermi jest w nich zaburzone, co skutkuje przyjęciem przez wszystkie komórki węzła fenotypu pierwotnej endodermi i w konsekwencji śmiercią zarodka tuż po implantacji [41]. Efekt letalny wywiera również brak

funkcjonalnej kopii genów z rodziny *Gata*. Powoduje on defekt w procesie formowania się pierwotnej endodermy oraz jej pochodnych: endodermy proksymalnej i dystalnej, a w konsekwencji prowadzi do śmierci zarodka w kilka dni po utworzeniu blastocysty.

W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań zmierzających do wyjaśnienia, w jaki sposób dochodzi do ustanowienia i segregacji epiblastu i hipoblastu w obrębie węzła zarodkowego. Wyniki tych badań doprowadziły do powstania dwóch alternatywnych teorii dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za ten proces.

3.2. Model klasyczny

Model ten zakłada, że węzeł zarodkowy we wczesnej blastocystyce jest homogeną populacją równocennych komórek, które mają zdolność do przekształcenia się zarówno w komórki hipoblastu, jak i epiblastu. Czynnikiem determinującym los komórek byłaby w tym wypadku, podobnie jak w hipotezie „*inside-outside*”, ich pozycja w węźle zarodkowym (ryc. 3A). Według tego modelu komórki znajdujące się na powierzchni węzła zarodkowego i sąsiadujące z jamą blastocysty tworzą pierwotną endodermę, a komórki zlokalizowane w środku przekształcą się w pierwotną ektodermę [54].

Tą teorię zdają się potwierdzać badania *in vitro* przeprowadzone z użyciem zarodkowych komórek macierzystych – ES (ang. *embryonic stem cells*). Komórki ES są uważane za odpowiednik komórek epiblastu w hodowli *in vitro*. Hodowla tych komórek bez obecności czynników hamujących różnicowanie indukuje ich agregację i formowanie struktur zwanych kulami zarodkowymi – EB (ang. *embryoid bodies*). Wydarzenia towarzyszące różnicowaniu się komórek budujących kule zarodkowe odzwierciedlają kolejność różnicowania zachodzącą podczas rozwoju *in vivo*. Wykazano, że na powierzchni zewnętrznej kul zarodkowych tworzy się warstwa pierwotnej endodermy, a wewnątrz tych struktur zajmuje pierwotna ektoderma.

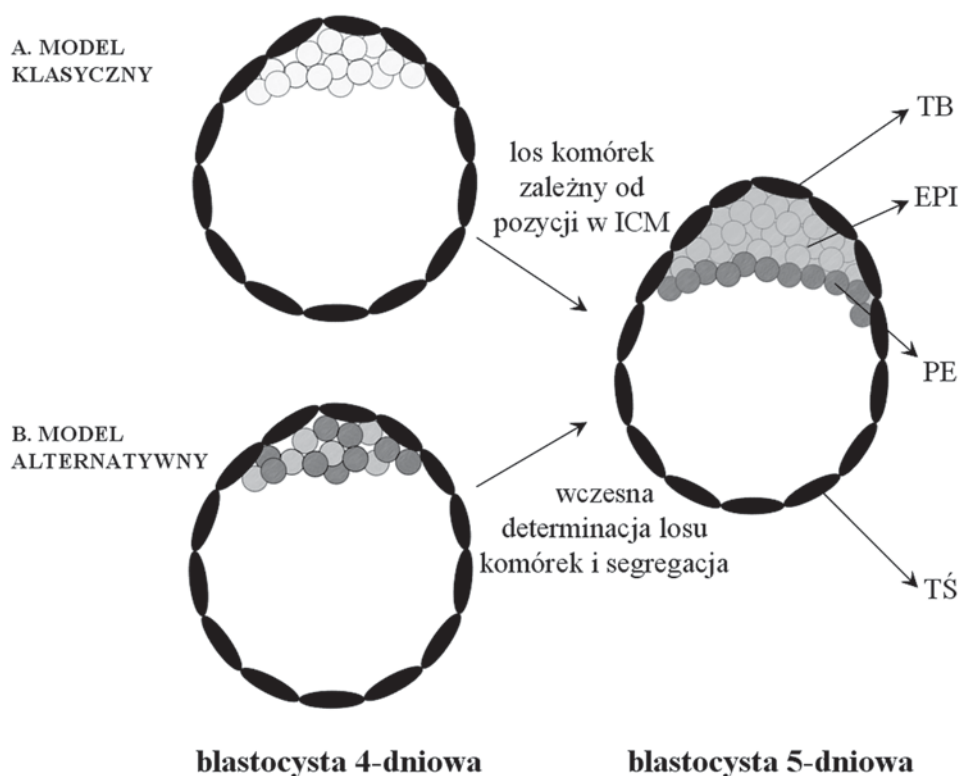
Dodatkowym potwierdzeniem wspomnianej teorii są badania dowodzące, że w wyizolowanych z wczesnych blastocyst węzłach zarodkowych na ich całej zewnętrznej powierzchni odtwarza się warstwa pierwotnej endodermy [4]. Świadczy to o wpływie położenia komórek w zarodku na determinację ich losu.

3.3. Model alternatywny

Druga, alternatywna hipoteza powstawania epiblastu i hipoblastu zakłada, że węzeł zarodkowy stanowi heterogenną populację komórek, które już na etapie wczesnej blastocysty są zdeterminowane do utworzenia pierwotnej ektodermy bądź pierwotnej endodermy (ryc. 3B). O kierunku ich różnicowania decydowałaby ekspresja specyficznych dla obu linii czynników transkrypcyjnych, zaś ułożenie poszczególnych komórek w węźle zarodkowym i powstawanie odrębnych warstw epiblastu i hipoblastu w późnej blastocystyce zależałoby od czynników wpływających na ich segregację i przemieszczanie.

Szereg przeprowadzonych badań zdaje się potwierdzać ten model. Po pierwsze wykazano, że część komórek węzła zarodkowego wczesnej blastocysty zawiera cytokeratynę filamentów pośrednich EndoA, będącą białkiem specyficznym dla linii

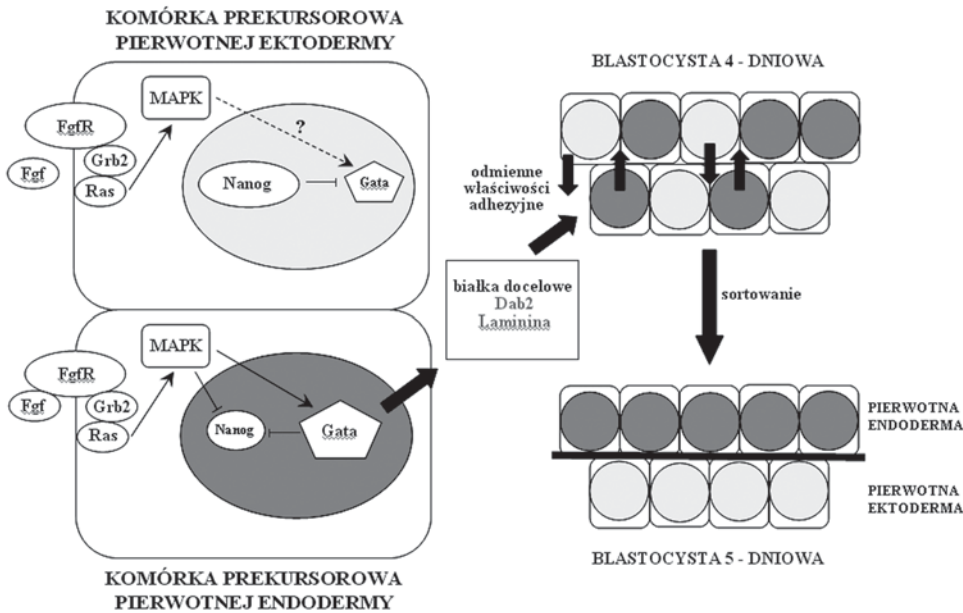
pozazarodkowej [4]. Po drugie, we wczesnym 4-dniowym zarodku, w którym nie zaszła jeszcze segregacja komórek do warstwy epiblastu i hipoblastu, czynniki transkrypcyjne – *Nanog* (specyficzny dla linii epiblastu) oraz charakterystyczne dla pierwotnej endodermy – *Gata4* lub *Lrp2* (ang. *low-density lipoprotein receptor related protein 2*) ulegają ekspresji w komórkach rozmieszczonych w sposób przypadkowy w różnych, niezachodzących na siebie rejonach węzła zarodkowego,



RYCINA 3. Wyodrębnianie i segregacja pierwotnej endodermy i pierwotnej ektodermy w obrębie węzła zarodkowego. Model klasyczny zakłada, że węzeł zarodkowy jest homogenną populacją komórek, których los zależy od pozycji w węzle zarodkowym (A). Model alternatywny sugeruje, iż węzeł zarodkowy jest heterogenną populacją komórek, które już na etapie wczesnej blastocysty różnią się ekspresją czynników transkrypcyjnych. Prawidłowe ułożenie komórek w węzle zarodkowym i powstanie warstw pierwotnej endodermy oraz pierwotnej ektodermy zależne jest od czynników wpływających na proces sortowania (B): TB – trofektoderma biegunowa, EPI – epiblast, PE – pierwotna endoderma, TS – trofektoderma ścienna

FIGURE 3. Specification and segregation of primitive ectoderm and primitive endoderm within the inner cell mass. The classical model assumes that the inner cell mass is a homogeneous population of cells whose fate depends on position in the inner cell mass (A). The alternative model suggests that the inner cell mass is a heterogeneous population of cells differing in the expression of transcription factors at the blastocyst stage. The cell position within the inner cell mass and formation of primitive ectoderm and primitive endoderm layers depends on factors affecting the cell sorting process (B). TB – polar trophectoderm; EPI – epiblast; PE – primitive endoderm; TS – mural trophectoderm

tworząc „mozaikowy” wzór ekspresji [4, 11]. Na tym wczesnym etapie nie obserwowano preferencyjnego lokowania się komórek ekspresyjujących te czynniki do określonych regionów wężła zarodkowego. Po trzecie, analiza pojedynczych komórek wężła zarodkowego wczesnej blastocysty metodą mikromacierzy wykazała istnienie dwóch grup komórek: jednej wykazującej ekspresję genu *Nanog* i drugiej ekspresyjnej czynnika *Gata* [21]. Kolejny dowód na potwierdzenie powyższej teorii pochodzi z badań, w których znakowano pojedyncze komórki wężła zarodkowego wczesnej blastocysty i śledzono ich los. Wstrzykiwano do nich mRNA białka zielonej fluorescencji – GFP (ang. *green fluorescent protein*), a następnie przeszczepiano takie zarodki do dróg rodnych biorecyrń i badano los znakowanych komórek po implantacji. Doświadczenie to wykazało, że komórki potomne znakowanych komórek wężła wchodziły w skład albo epiblastu albo hipoblastu, ale nigdy obu tych warstw.



RYCINA 4. Model segregacji komórek do dwóch odrębnych warstw wężła zarodkowego: epiblastu i hipoblastu w późnej blastocystyce (schemat adaptowany za zgodą wydawnictwa Elsevier: Dev cell [4] copyright 2006). Czynniki wzrostu fibroblastów (FGF) poprzez receptor na powierzchni docelowej komórki oddziałuje z białkiem Grb2. Kompleks ten aktywuje w komórce prekursorowej pierwotnej endodermi kaskadę białek Ras-MAPK, co prowadzi do ekspresji czynników transkrypcyjnych z rodziny Gata. Poprzez obecność białek docelowych dla Gata6 (Lamininy i Dab2) zmieniają się właściwości adhezyjne komórek, co umożliwia ich sortowanie do odpowiednich rejonów wężła zarodkowego. Nie jest jasne, jak dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego Nanog i represji Gata w komórkach prekursorowych epiblastu

FIGURE 4. Model of cell segregation into two separate layers of inner cell mass of the blastocyst: epiblast and hypoblast (reprinted from Dev Cell [4], copyright 2006, with permission from Elsevier). Fibroblast growth factor (FGF) interacts with the Grb2 protein through the receptor on the surface of the target cell. This complex activates the Ras-MAPK signaling pathway in the primitive endoderm progenitor cell that leads to the expression of Gata family transcription factors. Gata induces target genes (Laminin and Dab2), which change the adhesive properties of cells to enable their sorting into appropriate regions of the inner cell mass. It is not clear how Nanog is activated and Gata is repressed in the epiblast progenitor cells

Wynik ten sugeruje, że los komórek wężła zarodkowego wczesnej blastocysty jest już zdeterminowany [4]. Rezultaty tych badań przemawiają więc za tym, że węzeł zarodkowy jest raczej heterogenną populacją komórek o różnym potencjale rozwojowym, mieszaniną prekursorów hipoblastu oraz epiblastu, które następnie rozlokują się w odpowiednich rejonach wężła zarodkowego.

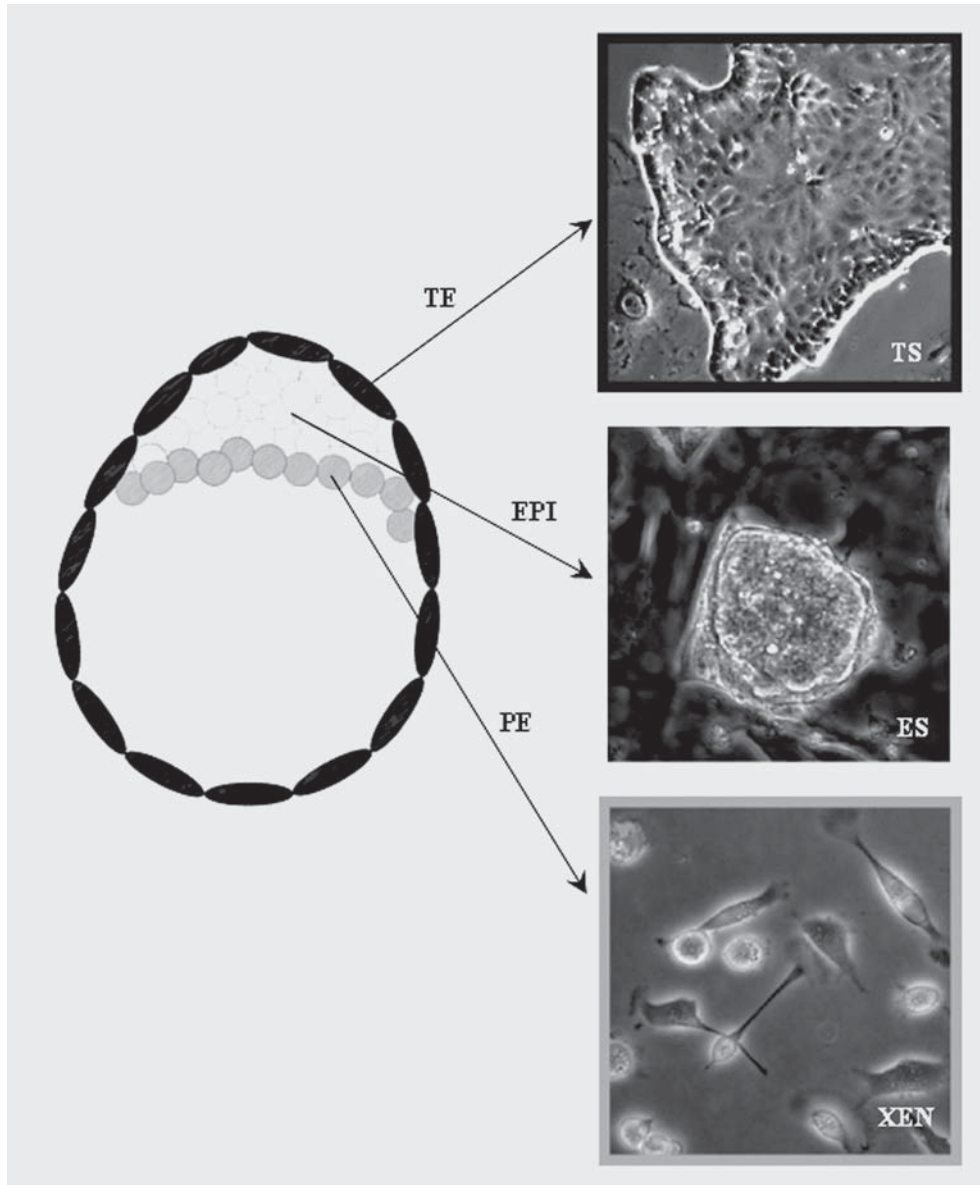
Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za powstanie dwóch populacji komórek (epiblastu i hipoblastu) nie zostały do końca poznane. Wydaje się, że proces ten zależy od wielu czynników. Jednym z nich może być czynnik wzrostu fibroblastów 4 – FGF4 (ang. *fibroblast growth factor 4*). Chazaud i współpracownicy [4] sugerują, że czynnik FGF4 może warunkować aktywność genu *Grb2* (ang. *growth factor receptor-bound protein 2*) kodującego białko zaangażowane w aktywację kaskady Ras-MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*), indukcję ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Gata6* oraz represję *Nanog* w pierwotnej endodermie (ryc. 4). Zablockowanie funkcji białka Grb2 skutkuje bowiem śmiercią zarodka w wyniku braku ekspresji *Gata6*, a co za tym idzie, formowania pierwotnej endodermy [4].

Za segregację komórek do dwóch odrębnych warstw (hipoblastu oraz epiblastu) w późnej blastocystyce mogą być odpowiedzialne odmienne właściwości adhezyjne tych komórek. Wykazano, że obecność Lamininy B1 oraz Dab2 (ang. *Disabled 2*) – białek, których ekspresja jest aktywowana przez czynnik transkrypcyjny *Gata6* – powoduje zmianę właściwości adhezyjnych komórek, umożliwiając ich sortowanie do odpowiednich rejonów wężła zarodkowego (ryc. 4). W zarodkach pozbawionych funkcjonalnej kopii genu *Dab2* komórki prekursorowe pierwotnej endodermy tracą zdolność do lokowania się na powierzchni wężła zarodkowego, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń morfogenezy [55]. Oprócz odmiennych właściwości adhezyjnych, w proces segregacji zaangażowana jest prawdopodobnie także migracja komórek oraz wybiórcza apoptoza. Współdziałanie wszystkich tych czynników prowadzi ostatecznie do stworzenia odrębnych linii komórkowych w zarodku [35, 40].

Najnowsze badania, w których śledzono dynamikę komórek wężła zarodkowego od stadium wczesnej do późnej blastocysty, wykazały, że wyodrębnianie warstw komórek epiblastu i hipoblastu jest procesem złożonym i łączy w sobie cechy obu wspomnianych hipotez [25]. Z analizy zdjęć poklatkowych wynika, że większość komórek jest prekursorem tylko jednej linii – epiblastu lub hipoblastu – i podlega aktywnemu procesowi sortowania do odpowiednich warstw, zależnemu od aktywności. Pewna część komórek we wczesnej blastocystyce wykazuje się jednak plastycznością i jest zdolna do przekształcenia się zarówno w komórki epiblastu, jak i hipoblastu, co wskazuje na rolę zarówno sortowania komórek, jak i indukcji zależnej od ich położenia w wyodrębnianiu PE i EPI.

4. KOMÓRKI MACIERZYSTE PIERWOTNYCH LINII KOMÓRKOWYCH

Z blastocyst hodowanych *in vitro*, w ściśle określonych warunkach, mogą powstać linie komórek macierzystych (ryc. 5), które mają szczególne właściwości. Z jednej strony są zdolne do samoodnawiania się, czyli wielokrotnych podziałów



RYCINA 5. Linie komórek macierzystych, które można uzyskać hodując blastocysty myszy *in vitro* (rycina adaptowana za zgodą wydawnictwa Wiley-Blackwell: Clin Genet [34] copyright 2005). Trofoblastyczne komórki macierzyste (TS) wywodzą się z trofektodermy (TE); zarodkowe komórki macierzyste (ES) można uzyskać hodując *in vitro* komórki węzła zarodkowego lub epiblastu (EPI); XEN – komórki macierzyste otrzymywane *in vitro* z pierwotnej endodermy (PE)

FIGURE 5. Stem cell lines that can be derived by *in vitro* culture of blastocyst (reprinted from Clin Genet [34], copyright 2005, with permission from Wiley-Blackwell). Trophoblast stem cells (TS) are derived from trophoblast (TE); embryonic stem cells (ES) may be obtained by *in vitro* culture of inner cell mass or epiblast (EPI); XEN – stem cells from the primitive endoderm (PE) lineage

komórkowych bez utraty stanu niezróżnicowanego, z drugiej zaś – są zdolne do różnicowania w specyficzne dla danej linii typy komórek. Wszystkie typy komórek macierzystych wykazują podobną morfologię oraz ekspresję genów jak komórki, z których się wywodzą. Mają również zbliżone do nich wymagania dotyczące czynników wzrostu. Wprowadzone do blastocyst biorą udział w formowaniu podobnych struktur w rozwijających się organizmach chimerowych. Z tego względu uznawane są za modele linii komórkowych w hodowli *in vitro*.

Największy potencjał rozwojowy mają komórki macierzyste pochodzące z węzła zarodkowego blastocysty. Z komórek węzła zarodkowego, jak również z pochodzącej z niego pierwotnej ektodermy można wyprowadzić linie zarodkowych komórek macierzystych ES. Komórki ES myszy są pluripotenne, czyli zdolne do różnicowania we wszystkie trzy listki zarodkowe: ektodermę, endodermę i mezodermę. Nie są natomiast w stanie spontanicznie różnicować się w komórki trofektodermy.

Pozostałe dwie linie komórkowe mogą również dać początek komórkom macierzystym, ale o bardziej ograniczonych zdolnościach rozwojowych. Warstwa trofektodermy biegunowej oraz pochodzącej z niej ektodermy pozazarodkowej może być źródłem trofoblastycznych komórek macierzystych TS, natomiast z pierwotnej endodermy można *in vitro* uzyskać komórki macierzyste pierwotnej endodermy XEN (ryc. 5).

4.1. Komórki ES – zarodkowe komórki macierzyste

Po raz pierwszy zarodkowe komórki macierzyste zostały wyprowadzone w latach 80. ub. wieku z węzłów zarodkowych blastocyst myszy przez dwie grupy badaczy – Evansa i Kaufmana [9] oraz Martin [23]. Podobne komórki wyprowadzono również z późniejszych stadiów rozwojowych: pierwotnej ektodermy [2, 48] oraz pierwotnych komórek płciowych [24].

Linie zarodkowych komórek macierzystych uzyskuje się hodując komórki węzła zarodkowego lub epiblastu w warunkach zapobiegających ich różnicowaniu. Standardowa procedura ich otrzymywania wymaga obecności warstwy odżywczej inaktywowanych pierwotnych fibroblastów zarodkowych myszy oraz pożywki wzbogaconej w czynnik przeciwbiałaczkowy, zapobiegający różnicowaniu – LIF (ang. *leukaemia inhibitory factor*). W takich warunkach mogą być one utrzymywane w stanie niezróżnicowanym przez wiele pasażi, zachowując przy tym prawidłowy kariotyp. Po wprowadzeniu do blastocysty komórki ES są zdolne do różnicowania się we wszystkie typy komórek linii somatycznej oraz komórki linii płciowej. Nie biorą natomiast udziału w tworzeniu struktur pozazarodkowych: trofektodermy oraz pierwotnej endodermy, co świadczy o tym, że są one pluripotenne, a nie totipotenne. Wykazują one również, podobnie jak komórki węzła zarodkowego i epiblastu, z których się wywodzą, ekspresję markerów niezróżnicowanego, pluripotentnego stanu – Oct4 oraz Nanog [3, 26]. Inaktywacja genu *Oct4* w komórkach ES powoduje utratę pluripotencji, różnicowanie w trofoblast i nabywanie właściwości komórek TS [16, 31]. Podobny efekt może wywołać nadekspresja genu *Cdx2* w komórkach ES [31, 49]. Utrata funkcji genu *Nanog* lub ekspresja genów z rodziny *Gata* skutkuje natomiast zmianą kierunku różnicowania komórek ES w komórki o cechach XEN [3, 16, 26].

4.2. Komórki TS – trofoblastyczne komórki macierzyste

Trofoblastyczne komórki macierzyste, hodowane w pożywce wzbogaconej czynnikiem wzrostu fibroblastów – FGF4 oraz heparyną, na warstwie odżywczej fibroblastów zarodkowych lub w obecności aktywinyA i TGF β 1 (ang. *transforming growth factor β 1*) [8], tworzą kolonie komórek wyglądem przypominające komórki nabłonkowe (ryc. 5) [32, 38]. Wielokrotnie pasażowane komórki TS zachowują cechy charakterystyczne dla komórek macierzystych. Po usunięciu czynnika FGF4 z pożywki, komórki TS tracą swój fenotyp i przekształcają się w różne typy komórek trofoblastycznych [17], a szczególnie w komórki o morfologii typowej dla trofoblastycznych komórek olbrzymich, wykazujące ekspresję markerów specyficznych dla zróżnicowanego trofoblastu, takich jak: Pl-1 (ang. *placental lactogen 1*) czy Hand1 [13]. Trofoblastyczne komórki macierzyste wprowadzone do jamy blastocysty są w stanie uczestniczyć w normalnym rozwoju chimerowego zarodka, jednak wchodzą w skład jedynie struktur pochodzenia trofoblastycznego, np. trzonu łożyskowego i komórek olbrzymich. Nie biorą natomiast udziału w formowaniu tkanek zarodkowych. Z tego względu macierzyste komórki trofoblastu są doskonałym materiałem do badania właściwości komórek linii trofoblastycznej.

4.3. Komórki XEN – macierzyste komórki pierwotnej endodermy

Kolejny typ komórek macierzystych wywodzi się z warstwy pierwotnej endodermy. Mają one postać okrągłych lub gwiaździstych komórek (ryc. 5), a do ich wzrostu i samoodnawiania się wymagana jest hodowla na podłożu w postaci żelatyny oraz w pożywce, w której uprzednio hodowano zarodkowe fibroblasty myszy – MEF CM (ang. *mouse embryonic fibroblast conditioned medium*). Komórki XEN wykazują ekspresję markerów charakterystycznych dla pochodnych pierwotnej endodermy, m.in. α -feto-proteiny, Gata4 i Gata6. Po przeszczepieniu tych komórek do jamy blastocysty w tworzących się chimerach uczestniczą one w budowie pęcherzyka żółtkowego [20].

5. PODSUMOWANIE

Pomimo wielu lat badań mechanizmy kontrolujące różnicowanie komórek w trakcie rozwoju zarodka oraz w hodowli *in vitro* nie zostały do końca poznane. Wiadomo na pewno, że o losie komórek decyduje wzajemna zależność między specyficznymi czynnikami transkrypcyjnymi, modyfikacjami epigenetycznymi oraz pozycją i polarnością komórek. Zgłębienie tych zależności jest konieczne dla lepszego zrozumienia natury komórek macierzystych, które można uzyskać hodując zarodki przedimplantacyjne *in vitro*. Jest to o tyle ważne, że komórki macierzyste ze względu na swoje unikalne właściwości (zdolność do samoodnowy i różnicowania) otwierają nowe możliwości nie tylko dla badań podstawowych dotyczących wczesnego rozwoju zarodkowego, ale przede wszystkim dla medycyny regeneracyjnej w opracowywaniu terapii nieprawidłowo funkcjonujących lub uszkodzonych tkanek i narządów.

PODZIĘKOWANIA

Autorki pragną serdecznie podziękować Panu Profesorowi Andrzejowi K. Tarkowskiemu oraz Panu Profesorowi Markowi Maleszewskiemu za cenne uwagi dotyczące niniejszej pracy.

LITERATURA

- [1] ALARCÓN VB, MARIKAWA Y. Unbiased contribution of the first two blastomeres to mouse blastocyst development. *Mol Reprod Dev* 2005; **72**: 354–361.
- [2] BRONS IG, SMITHERS LE, TROTTER MW, RUGG-GUNN P, SUN B, CHUVADE SOUSALOPES SM, HOWLETT SK, CLARKSON A, AHRlund-RICHTER L, PEDERSEN RA. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007; **448**: 191–195.
- [3] CHAMBERS I, COLBY D, ROBERTSON M, NICHOLS J, LEE S, TWEEDIE S, SMITH A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; **113**: 643–655.
- [4] CHAZAUD C, HOULISTON Y, PAWSON T, ROSSANT J. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell* 2006; **10**: 615–624.
- [5] CHRÓŚCICKAA, KOMOROWSKI S, MALESZEWSKI M. Both blastomeres of the mouse 2-cell embryo contribute to the embryonic portion of the blastocyst. *Mol Reprod Dev* 2004; **68**: 308–312.
- [6] DIETRICH JE, HIIRAGI T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* 2007; **134**: 4219–4231.
- [7] ELLING U, KLASSEN C, EISENBERGER T, ANLAG K, TREIER M. Murine inner cell mass-derived lineages depend on Sall4 function. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **103**: 16319–16324.
- [8] ERLBACHER A, PRICE KA, GLIMCHER LH. Maintenance of mouse trophoblast stem cells proliferation by TGF-beta/activin. *Dev Biol* 2004; **275**: 158–169.
- [9] EVANS MJ, KAUFMAN MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; **292**: 154–156.
- [10] GARDNER RL, DAVIES TJ. Is the plane of first cleavage related to the point of sperm entry in the mouse? *Reprod Biomed Online* 2003; **6**: 157–160.
- [11] GERBE F, COX B, ROSSANT J, CHAZAUD C. Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev Biol* 2008; **313**: 594–602.
- [12] GOLDIN SN, PAPAIOANNOU V.E. Paracrine action of FGF4 during pre-implantation development maintains trophoblast and primitive endoderm. *Genesis* 2003; **36**: 4219–4231.
- [13] HEMBERGER M, HUGHES M, CROSS JC. Trophoblast stem cells differentiate *in vitro* into invasive trophoblast giant cells. *Dev Biol* 2004; **271**: 362–371.
- [14] HIIRAGI T, SOLTER D. First cleavage plane of the mouse egg is not predetermined but defined by topology of the two apposing pronuclei. *Nature* 2004; **430**: 360–364.
- [15] HIIRAGI T, ALARCÓN VB, FUJIMORI T, LOUVET-VALLEE S, MALESZEWSKI M, MARIKAWA Y, MARO B, SOLTER D. Where do we stand now? Mouse early embryo patterning meeting in Freiburg, Germany. *Int J Dev Biol* 2006; **50**: 581–586; discussion 586–587.
- [16] HOUGH SR, CLEMENTS I, WELCH PJ, WIEDERHOLT KA. Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of Oct4 and Nanog. *Stem Cells* 2006; **24**: 1467–1475.
- [17] HUGHES M, DOBRIC N, SCOTT IC, SU L, STAROVIC M, ST-PIERRE B, EGAN SE, KINGDOM JC, CROSS JC. The Hand1, Stra13 and Gcm1 transcription factor override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells. *Dev Biol* 2004; **271**: 26–37.
- [18] JEDRUSIK A, PARFITT DE, GUO G, SKAMAGKI M, GRABAREK JB, JOHNSON MH, ROBSON P, ZERNICKA-GOETZ M. Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophoblast and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes Dev* 2008; **22**: 2692–2706.
- [19] JOHNSON MH, MCCONNELL JM. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2004; **15**: 583–597.

- [20] KUNATH T, ARNAUD D, UY GD, OKAMOTO I, CHUREAU C, YAMANAKA Y, HEARD E, GARDNER RL, AVNER P, ROSSANT J. Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development* 2005; **132**: 1649–1661.
- [21] KURIMOTO K, KABUTA Y, OHINATA Y, ONO Y, UNO KD, HAMADA RG, UEDA HR, SAITOU M. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**(5): e42.
- [22] LIU L, CZERWIEC E, KEEFE DL. Effect of ploidy and parental genome composition on expression of Oct-4 protein in mouse embryos. *Gene Expr Patterns* 2004; **4**: 433–441.
- [23] MARTIN GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 7634–7638.
- [24] MATSUI Y, ZSEBO K, HOGAN BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; **70**: 841–847.
- [25] MEILHAC SM, ADAMS RJ, MORRIS SA, DANCKAERT A, LE GARREC JF, ZERNICKA-GOETZ M. Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 2009; **331**: 210–221.
- [26] MITSUI K, TOKUZAWA Y, ITOH H, SEGAWA K, MURAKAMI M, TAKAHASHI K, MARUYAMA M, MAEDA M, YAMANAKA S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; **113**(5): 631–642.
- [27] MOTOSUGI N, BAUER T, POLANSKI Z, SOLTER D, HIRAGI T. Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes Dev* 2005; **19**: 1081–1092.
- [28] NG RK, DEAN W, DAWSON C, LUCIFERO D, MADEJA Z, REIK W, HEMBERGER M. Epigenetic restriction of embryonic cell lineage fate by methylation of *Elf5*. *Nature Cell Biol* 2008; **10**: 1280–1290.
- [29] NISHIOKA N, YAMAMOTO S, KIYONARI H, SATO H, SAWADAA, OTA M, NAKAO K, SASAKI H. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 2008; **125**: 270–283.
- [30] NISHIOKA N, INOUE K, ADACHI K, KIYONARI H, OTA M, RALSTON A, YABUTA N, HIRAHARA S, STEPHENSON RO, Ogonuki N, MAKITA R, KURIHARA H, MORIN-KENSICKI EM, NOJIMA H, ROSSANT J, NAKAO K, NIWA H, SASAKI H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* 2009; **16**: 398–410.
- [31] NIWA H, TOYOOKA Y, SHIMOSATO D, STRUMPF D, TAKAHASHI K, YAGI R, ROSSANT J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005; **123**: 917–929.
- [32] ODA M, SHIOTA K, TANAKA S. Trophoblast stem cells. *Methods in Enzymology* 2006; **49**: 387–400.
- [33] O'NEILL LP, VERMILYEA MD, TURNER BM. Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. *Nature Genet* 2006; **38**: 835–841.
- [34] PLUSA B, FRANKENBERG S, CHALMERS A, HADJANTONAKIS AK, MOORE CA, PAPALOPULU N, PAPAIOANNOU VE, GLOVER DM, ZERNICKA-GOETZ M. Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the pre-implantation mouse embryo. *J Cell Sci* 2005; **118**: 505–515.
- [35] PLUSA B, PILISZEK A, FRANKENBERG S, ARTUS J, HADJANTONAKIS A. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 2008; **135**: 3081–3091.
- [36] RALSTON A, ROSSANT J. Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clin Genet* 2005; **68**: 106–112.
- [37] RALSTON A, ROSSANT J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2007; **313**: 614–629.
- [38] RIELLAND M, HUE I, RENARD JP, ALICE J. Trophoblast stem cell derivation, cross-species comparison and use of nuclear transfer: new tools to study trophoblast growth and differentiation. *Dev Biol* 2008; **322**: 1–10.
- [39] ROSSANT J, CROSS JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2001; **2**: 538–548.
- [40] RULAME, CAIKQ, MOORE R, YANG DH, STAUB CM, CAPO-CHICHI CD, JABLONSKI SA, HOWE PH, SMITH ER, XU XX. Cell autonomous sorting and surface positioning in the formation of primitive endoderm in embryoid bodies. *Genesis* 2007; **45**: 327–338.
- [41] SINGH AM, HAMAZAKI T, HANKOWSKI KE, TERADA N. A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; **25**: 2534–2542.

- [42] STRUMPF D, MAO CA, YAMANAKA Y, RALSTON A, CHAWENSAKSOPHAK K, BECK F, ROSSANT J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005; **132**: 2093–2102.
- [43] SUWINSKAA, CZOŁOWSKA R, OZDZENSKI W, TARKOWSKI AK. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol* 2008; **322**: 133–144.
- [44] TARKOWSKI AK. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 1959; **184**: 1286–1287.
- [45] TARKOWSKI AK. Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 1961; **190**: 857–860.
- [46] TARKOWSKI AK. Mouse chimaeras revisited: recollections and reflections. *Int J Dev Biol* 1998; **42**: 903–908.
- [47] TARKOWSKI AK, WRÓBLEWSKA J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 1967; **18**: 155–180.
- [48] TESAR PJ, CHENOWETH JG, BROOK FA, DAVIES TJ, EVANS EP, MACK DL, GARDNER RL, MCKAY RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007; **448**: 196–199.
- [49] TOLKUNOVA E, CAVALERI F, ECKARDT S, REINBOLD R, CHRISTENSON LK, SCHOLER HR, TOMILIN A. The Caudal-related protein Cdx2 promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 139–144.
- [50] TORRES-PADILLA ME, PARFITT DE, KOUZARIDES T, ZERNICKA-GOETZ. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 2007; **445**: 214–218.
- [51] VINOT S, LE T, OHNO S, PAWSON T, MARO B, LOUVET-VALLEE S. Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol* 2005; **282**: 307–319.
- [52] WAKSMUNDZKA M, WIŚNIEWSKAA, MALESZEWSKI M. Allocation of cells in mouse blastocyst is not determined by the order of cleavage of the first two blastomeres. *Biol Reprod* 2006; **75**: 582–587.
- [53] YAGIR, KOHN MJ, KARAVANOVA I, KANEKO KJ, VULLHORST D, DEPAMPHILIS ML, BUONANNO A. Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 2007; **34**(21): 3827–3836.
- [54] YAMANAKA Y, RALSTON A, STEPHENSON RO, ROSSANT J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 2006; **235**: 2301–2314.
- [55] YANG DH, CAI KQ, ROLAND IH, SMITH ER, XU XX. Disabled-2 is an epithelial surface positioning gene. *J Biol Chem* 2007; **282**: 13114–13122.
- [56] ZHANG J, Sall 4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 1114–1123.
- [57] ZERNICKA-GOETZ M. Developmental cell biology: cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 919–928.
- [58] ZERNICKA-GOETZ M, MORRIS SA, BRUCE AW. Making a firm decision : multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nat Genet* 2009; **10**: 467–477.

Dr Aneta Suwińska
ul. Wąska 41, 05-119 Legionowo,
e-mail: asuwinska@biol.uw.edu.pl