

# Różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach ssaków – różnice i podobieństwa międzygatunkowe

dr Katarzyna Filimonow<sup>1</sup>,  
dr Anna Chołoniewska<sup>2</sup>,  
mgr Katarzyna Michniak<sup>1</sup>,  
dr hab. Anna Piliszek<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Institut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, Zakład Embriologii Doświadczalnej, Institut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, Jastrzębiec

<sup>2</sup>Laboratorium Badawcze – Bank Komórek, Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_417](https://doi.org/10.18388/pb.2021_417)

✉ autor korespondujący: a.piliszek@igbzpan.pl

**Słowa kluczowe:** endoderma pierwotna, epiblast, rozwój przedimplantacyjny, trofektoderma

**Wykaz stosowanych skrótów:** Epi – epiblast, ICM – węzeł zarodkowy, PrE – endoderma pierwotna, TE – trofektoderma

**Podziękowania:** Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2017/26/E/NZ3/01205 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki

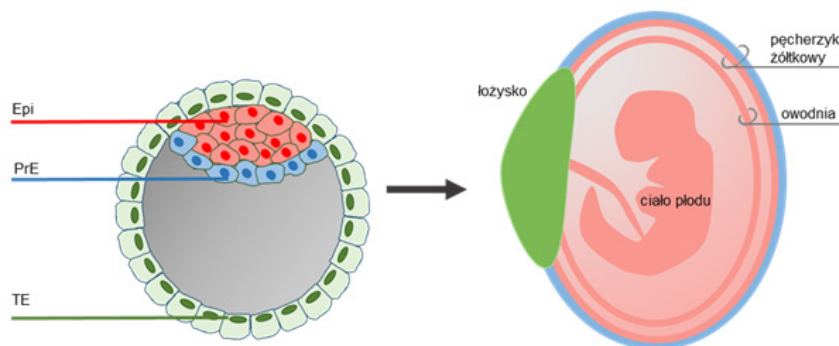
## STRESZCZENIE:

Rozwój zarodkowy ssaków łożyskowych zachodzi wewnątrz organizmu matki, co wymaga wytworzenia odpowiednich struktur dla podtrzymania tego rozwoju zarówno przez organizm matki, jak i przez rozwijający się zarodek. Pierwsze etapy rozwoju zarodkowego ssaków, poprzedzające implantację, to okres różnicowania pierwszych linii komórkowych – epiblastu (z którego rozwinię się ciało płodu) oraz linii pozazarodkowych: trofektodermy (odpowiedzialnej za implantację i powstanie łożyska) i endodermy pierwotnej (dającej początek pęcherzykowi żółtkowemu). Ich powstanie jest konieczne dla dalszego rozwoju i jest cechą wspólną rozwoju wszystkich ssaków łożyskowych, jednak ramy czasowe i mechanizmy molekularne odpowiedzialne za te procesy różnią się u różnych gatunków ssaków.

## STRUKTURY POZAZARODKOWE – PRZYSTOSOWANIE DO ŻYWORODNOŚCI

Ssaki żyworodne (łożyskowce i torbacze) to grupa kręgowców, których rozwój zarodkowy odbywa się wewnątrz organizmu matki. Ta niewątpliwa zdolność ewolucyjna pozwala na ochronę zarodka przed niekorzystnym wpływem środowiska oraz na całkowite lub częściowe uniezależnienie się od substancji odżywczych uzyskiwanych z żółtka, na rzecz pobierania ich bezpośrednio od matki. Żyworodność wymaga zarówno adaptacji organizmu matki do zagnieżdżenia zarodka i podtrzymywania jego rozwoju w czasie ciąży, jak i wytworzenia przez sam zarodek odpowiednich struktur pozwalających na jego implantację i dalszy kontakt z organizmem matki. Te tkanki i organy – łożysko i błony płodowe – nazywamy strukturami pozazarodkowymi. Nie tworzą one tkanek dorosłego organizmu, ale są niezbędne dla prawidłowego rozwoju zarodka aż do urodzenia.

Różnicowanie komórek zarodka ssaka na linii zarodkowej i pozazarodkowej zachodzi już w pierwszym tygodniu po zapłodnieniu. Pierwsze etapy różnicowania, które zachodzą jeszcze na etapie przedimplantacyjnym – czyli przed zagnieżdżeniem się zarodka w ścianie macicy – prowadzą do powstania trzech linii komórkowych (Ryc. 1). W tym okresie zarodek osiąga stadium blastocysty – wypełnionego płynem pęcherzyka, w którym zewnętrzną warstwę stanowi trofektoderma (TE), natomiast wewnątrz, na jednym z biegunów, znajduje się zwarta grupa komórek zwana węzłem zarodkowym (ICM, ang. *inner cell mass*). Trofektoderma to linia pozazarodkowa odpowiedzialna za implantację zarodka i wytworzenie zarodkowej części łożyska. Komórki węzła zarodkowego ulegają natomiast dalszemu różnicowaniu, w wyniku którego powstają dwie kolejne linie: epiblast (Epi), dający początek wszystkim komórkom ciała zarodka oraz części błon płodowych, a także endoderma pierwotna (PrE, ang. *primitive endo-*



**Rycina 1.** Różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach ssaków. W zarodku na etapie blastocysty wyróżnić możemy trzy linie komórkowe – epiblast (Epi, kolor czerwony), endodermy pierwotną (PrE, kolor niebieski) i trofektodermy (TE, kolor zielony). W trakcie dalszego rozwoju TE tworzy zarodkową część łożyska, Epi – ciało płodu i część błon płodowych, a PrE – pęcherzyk żółtkowy.

**Tabela 1.** Różnice morfologiczne oraz przedziały czasowe istotnych punktów rozwoju zarodków ssaków

Gatunek	Średnica zygoty	Kompakcja (stadium - liczba komórek / dni post coitum)	Kawitacja (dni post coitum/ po inseminacji)	Implantacja (dni post coitum)	Długość całkowita ciąży (od zapłodnienia)	Masa urodzeniowa (w gramach)
Mysz ( <i>Mus musculus</i> )	~ 70-80 $\mu\text{m}$ [1]	8-kom/3 dpc [2, 3]	3 [3]	4,5 [4]	19-21 dni	2
Człowiek ( <i>Homo sapiens</i> )	~100-175 $\mu\text{m}$ [5]	8-16-kom/3,5 dpc [6-8]	5-6 [9,10]	7-10 [10]	270 dni	3000
Bydło ( <i>Bos taurus</i> )	~ 150 $\mu\text{m}$ [11]	16-32-kom/5 dpc [12-14]	8-9 [13,14]	19-21 [15]	283 dni	30000-45000
Świnia ( <i>Sus scrofa</i> )	130 $\mu\text{m}$ [16]	32-kom/4-5 dpc [17]	6-7 [17]	18 [18]	113 dni	84
Owca ( <i>Ovis aries</i> )	~130 $\mu\text{m}$ [19]	16-kom/4-5 dpc [20, 21]	7-8 [20,21]	16-18 [22]	~ 150 dni	~6000
Królik ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	~120 $\mu\text{m}$ [23]	32-kom/3 dpc [12,24]	3 [25]	6-7 [26,27]	~ 31 dni	54

derm, nazywana również hipoblastem), linia pozazarodkowa która w dalszym rozwoju utworzy pęcherzyk żółtkowy.

Powstanie tych linii w okresie przedimplantacyjnym jest niezbędne dla dalszego prawidłowego rozwoju i jest cechą wspólną rozwoju zarodkowego wszystkich ssaków. Jednak szczegółowe mechanizmy różnicowania są częściowo rozbieżne dla różnych gatunków, co wiąże się między innymi z różnicami w anatomii i fizjologii rozrodu poszczególnych gatunków (np. długość ciąży) (Tabela 1). Niniejszy artykuł opisuje molekularne podstawy różnicowania trzech pierwszych linii komórkowych w rozwoju ssaków, w tym gatunków zwierząt laboratoryjnych, gospodarskich i człowieka.

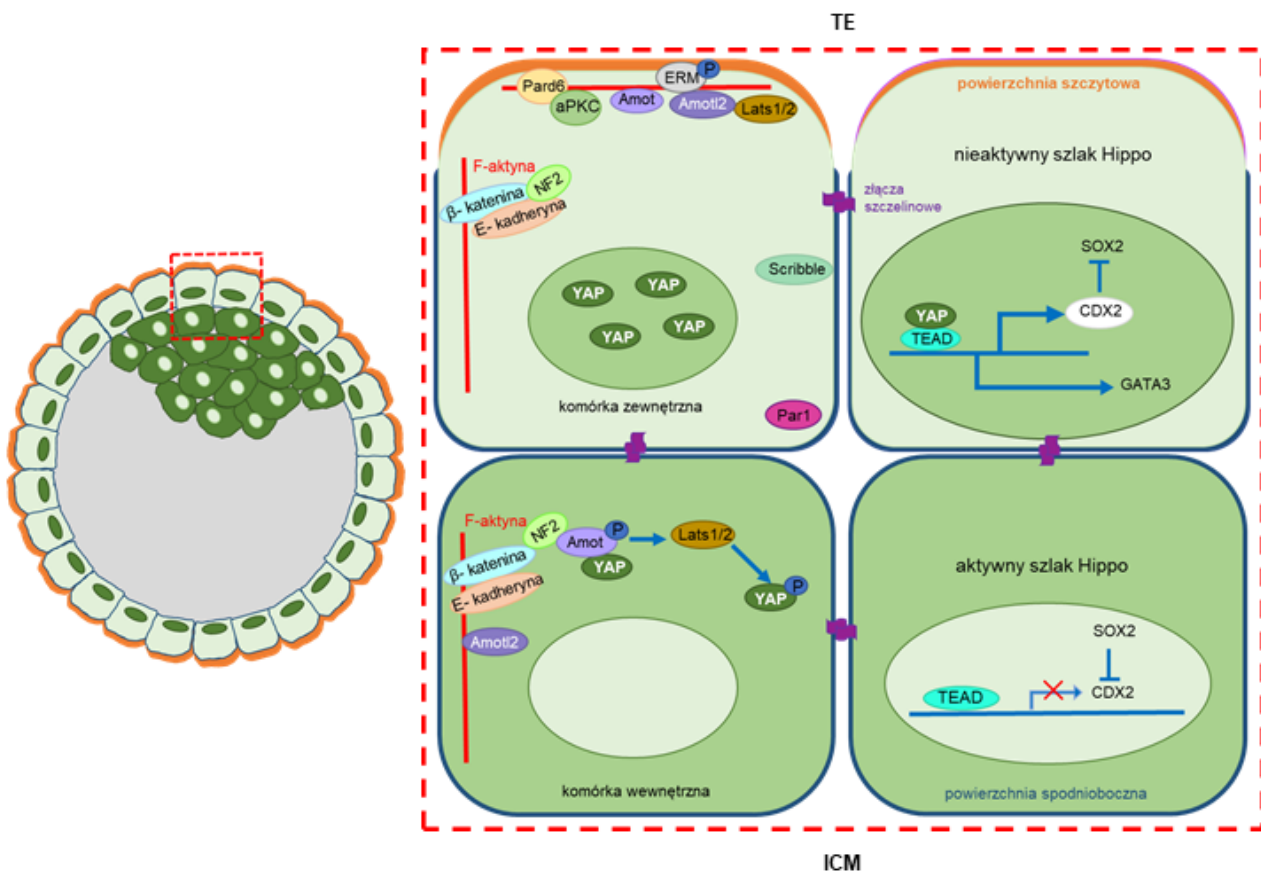
## PIERWSZE DECYZJE ROZWOJOWE - RÓŻNICOWANIE TROFEKTODERMY

Zygota - pierwsza komórka przyszłego organizmu - daje początek wszystkim późniejszym komórkom i tkankom. Tę właściwość - zdolność komórek do różnicowania się w dowolny typ komórek zarodkowych i pozazarodkowych organizmu - nazywamy totipotencją. Komórki zarodków ssaków zachowują totipotencję na wczesnych stadiach rozwoju: u myszy do stadium 4-komórkowego [1,2], natomiast u gatunków takich jak królik, owca, świnia, koń czy bydło nawet do stadium 8-komórkowego [3]. W dalszym rozwoju totipotencja musi zostać utracona, aby mogły pojawić się wyspecjalizowane linie komórkowe i tkanki. Pierwszy etap różnicowania w zarodku ssaków łożyskowych prowadzi do powstania linii trofektoderm, niezbędnej do implantacji zarodka w ścianie macicy.

Podczas pierwszych podziałów komórkowych w zarodku ssaka, nazywanych bruzdkowaniem, całkowita masa i objętość zarodka nie ulegają zmianie, a komórki zarodka, zwane blastomerami, z każdym cyklem komórkowym stają się coraz mniejsze. W kilkukomórkowym zarodku, nazywanym na tym etapie morulą, następują kluczowe zmiany morfologiczne prowadzące do zjawiska kompaktacji [4]. W trakcie kompaktacji zachodzi przebudowa białek cytoskieletu oraz zmiana lokalizacji niektórych białek adhezyjnych. W konsekwencji dochodzi do zmian w sposobie połączeń między blastomerami, które zaczynają ściślej do siebie przylegać, tak aby w efekcie utworzyć zwartą strukturę przy-

pominającą wyglądem kulę [4,5]. Ramy czasowe kompaktacji u ssaków są typowe dla każdego gatunku, począwszy od 8-komórkowego stadium u myszy, 16-komórkowego stadium u owcy do 32-komórkowego stadium u królika i bydła (Tabela 1) [6-8]. W zarodku świni kompaktacja rozpoczyna się na stadium 8-komórkowym, aż do kulminacji w stadium 32-komórkowym [9]. Pomimo tej stosunkowo dużej zmienności w czasie występowania kompaktacji u różnych gatunków ssaków, inicjacja zdarzenia jest ściśle kontrolowana, ponieważ nieodpowiedni czas kompaktacji może prowadzić do zaburzenia kolejnych kluczowych etapów rozwoju zarodkowego, między innymi tworzenia się blastocysty [10].

Do zajścia procesu kompaktacji niezbędna jest aktywność kadheryny E (inaczej uwomoruliny), białka adhezyjnego zależnego od jonów wapniowych [11,12]. Powyższą hipotezę potwierdziła obserwacja zarodków mysich hodowanych w pożywce pozbawionej jonów wapnia (lub suplementowanej przeciwiałami neutralizującymi kadherynę E) co spowodowało zahamowanie procesu kompaktacji, a umieszczenie już skompaktowanych zarodków w tak zmodyfikowanej pożywce powodowało całkowitą dekompaktację zarodków w stadium moruli [4,13,14]. Podobną zależność stwierdzono także w przypadku zarodków ludzkich [15,16], świńskich [17] oraz chomiczych [18]. Udział kadheryny E w procesie kompaktacji został potwierdzony również w zarodkach krowy [19] i owcy [20]. Najnowsze badania na modelu mysim wskazują, że kadheryna E wpływa na proces kompaktacji poprzez reorganizację cytoskieletu aktynowo-miozynowego [21-23], którego przebudowę zaobserwowano również podczas inicjacji kompaktacji w zarodkach świni [9,24]. W wyniku kompaktacji w błonie komórkowej blastomerów można wyszczególnić powierzchnię szczytową (apikalną) - kontaktującą się ze środowiskiem zewnętrznym oraz powierzchnię spodnio-boczną (bazolateralną) - znajdującą się na styku komórek [25]. U myszy polaryzacja jest inicjowana przez utworzenie szczytowej powierzchni bogatej w ezrynę. [26]. Ezryna jest białkiem z rodziny ERM (ang. *ezrin/radixin/moesin*), które łączy cytoskielet aktynowy i białka błony komórkowej. Wiadomo, że lokalizuje się w mikroskoscach komórek nabłonkowych, a także we wczesnych blastomerach [27-29]. U myszy znane są białka polaryzacji, takie jak atypowa kinaza białkowa C (aPKC - ang. *atypical protein kinase C*) [30] oraz grupa białek PAR (ang. *partitio-*



**Rycina 2.** Regulacja różnicowania trofektodermy (TE) i węzła zarodkowego (ICM) przez szlak sygnałowy Hippo. W spolaryzowanych komórkach TE szlak Hippo jest nieaktywny: YAP ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie aktywuje transkrypcję genów specyficznych dla TE (*CDX2*). W niespolaryzowanych komórkach ICM szlak Hippo jest aktywny: YAP ulega fosforylacji a geny specyficzne dla TE pozostają nieaktywne.

*ning defective*): PARD3 [31,32] i PARD6b [33], które również lokalizują się na powierzchni szczytowej (powierzchni blastomeru zwróconej na zewnątrz) podczas gdy PAR1 i Scribble są zlokalizowane spodnio-bocznie tj. w obszarze styku komórek [25] (Ryc. 2).

Pomimo że kompaktacja i polaryzacja są inicjowane w podobnym momencie rozwoju przedimplantacyjnego oraz przy obecności podobnych zespołów białek [34,35], mogą występować niezależnie [36–38]. U wielu gatunków ssaków w trakcie każdego kolejnego podziału komórkowego blastomery ulegają dekompaktacji, a następnie ponownej kompaktacji po zakończeniu wszystkich podziałów komórkowych (m.in. u bydła [39,40], świni [9] i myszy [41]). Kompaktacja w połączeniu z polaryzacją stanowią pierwsze etapy w różnicowaniu blastomerów, inicjując kaskadę kolejnych wydarzeń prowadzącą do różnicowania linii komórkowych w zarodkach ssaków [42].

Istotną rolę w różnicowaniu TE i ICM w zarodkach myszy odgrywają również różnice w kurczliwości komórek na stadium moruli. Tworzenie domeny szczytowej o niskiej kurczliwości podczas kompaktacji i polaryzacji we wczesnym rozwoju zarodkowym powoduje różnice w rozkładzie sił mechanicznych (generowanych przez filamenty aktynowe i miozynowe cytoszkieletu korytkalnego), które wpływają na położenie komórek podczas kolejnych podziałów. W

rezultacie spolaryzowane komórki dziedziczące domenę szczytową są mniej kurczliwe, i otaczają sąsiadujące z nimi bardziej kurczliwe komórki niespolaryzowane, różnicując się w TE [21,43]. Silnie kurczliwe komórki niepolarne konkurują o pozycję wewnątrz zarodka i są internalizowane w wyniku asymetrycznego podziału, albo ulegają procesowi internalizacji szybko po podziale, dając początek komórkom ICM [21,43].

### ROLA SZLAKU SYGNAŁOWEGO HIPPO W RÓŻNICOWANIU TROFEKTODERMY

We wczesnych badaniach rozwoju zarodkowego myszy stwierdzono, że różnice w położeniu komórek w zarodku na stadium moruli determinują przyszły los komórek. Zewnętrzne blastomery różnicują w kierunku TE, natomiast wewnętrzne będą budować węzeł zarodkowy (model „inside-outside”) [44]. Ostatnie badania wykazały, że to szlak sygnałowy Hippo jest odpowiedzialny za interpretację sygnałów polaryzacyjnych w moruli myszy oraz za inicjowanie programu specyficznego dla TE w komórkach zewnętrznych [21,45–48]. Najnowsza teoria różnicowania TE/ICM łączy zatem elementy modelu „inside-outside”, a także zmiany w rozkładzie sił mechanicznych z polaryzacją i aktywnością szlaku Hippo. W wewnętrznych, niespolaryzowanych komórkach, szlak Hippo pozostaje aktywny. Białka AMOT (angiomotyna) i AMOTL2 (ang. *angiomin-like 2*) zlokaliz-

zowane są w połączeniach przylegających, a AMOT ulega fosforylacji przez kinazę LATS1/2 (ang. *Large tumor suppressor kinase 1/2*), tworząc z nią kompleks. LATS1/2 fosforyluje YAP (ang. *yes associated protein*), uniemożliwiając jego przemieszczenie do jądra komórkowego, a w konsekwencji nie dochodzi do interakcji YAP z TEAD4 (ang. *TEA domain transcription factor 4*), co prowadzi do zablokowania transkrypcji genów odpowiedzialnych za różnicowanie TE [36] (Ryc. 2). W komórkach zewnętrznych obecność spolaryzowanej domeny szczytowej hamuje aktywność szlaku Hippo. Białka PAR-aPKC zlokalizowane w apikalnej części błony wiążą AMOT i AMOTL2, powodując ich przemieszczenie z połączeń przylegających do domeny apikalnej [36, 46, 49]. Nieaktywne w tym czasie kinazy LATS1/2 umożliwiają translokację YAP do jądra komórkowego oraz przyłączenie go do czynnika transkrypcyjnego TEAD4, interakcja YAP-TEAD4 indukuje transkrypcję *CDX2* (ang. *caudal type homeobox 2*) i *GATA3* (ang. *GATA binding protein 3*) [47,48,50] genów kodujących kluczowe czynniki transkrypcyjne determinujące różnicowanie komórek TE.

Rola szlaku Hippo w różnicowaniu trofektodermy została dotychczas najlepiej poznana w zarodkach myszy, jednak aktywność tego szlaku jest konserwowana ewolucyjnie, o czym świadczą badania potwierdzające udział szlaku Hippo w rozwoju zarodkowym torbaczy [51]. Obecność kluczowych elementów szlaku Hippo takich jak TEAD4 i YAP została również stwierdzona na stadium moruli i blastocysty u człowieka [52], świni [53] bydła [52,54], a także konia [55]. Ostatnie badania wykazały także, że obniżenie ekspresji *TEAD4* hamuje rozwój zarodków świni w stadium blastocysty [53]. Można więc sądzić, że aktywność szlaku Hippo jest kluczowym mechanizmem odpowiedzialnym za różnicowanie TE i ICM w przedimplantacyjnym rozwoju ssaków.

## KAWITACJA

Spolaryzowane blastomery mogą dzielić się w taki sposób, że obie komórki potomne dziedziczą bogatą w ezyrnę domenę szczytową i utrzymują pozycję zewnętrzną lub, jeśli płaszczyzna podziału jest równoległa do powierzchni zarodka, asymetryczny podział może spowodować, że tylko jedna z komórek potomnych odziedziczy powierzchnię szczytową (pozostając spolaryzowaną i utrzymując kontakt ze środowiskiem zewnętrznym), podczas gdy drugi, niespolaryzowany blastomer będzie umiejscowiony wewnątrz zarodka [56–58]. W zarodku myszy spolaryzowane blastomery otaczają komórki niespolaryzowane, stopniowo tworząc szczelną strukturę o charakterze nabłonkowym [5,21,59], co zostało potwierdzone również w zarodkach człowieka, świni i krowy [5,6,9,19,21,59–64]. Różnicowanie komórek zewnętrznych w kierunku w pełni funkcjonalnego nabłonka TE wymaga także aktywności ATPaz Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> i akwaporyn, które są ważne dla transportu aktywnego jonów do przestrzeni wewnątrzkomórkowej oraz dla transportu pasywnego wody wzdłuż gradientu osmotycznego [62,63,65,66].

## RÓŻNICOWANIE TROFEKTODERMY - ROLA CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH

Chociaż różnicowanie linii TE rozpoczyna się już na stadium moruli, to do utrzymania tej linii na stadium blastocysty

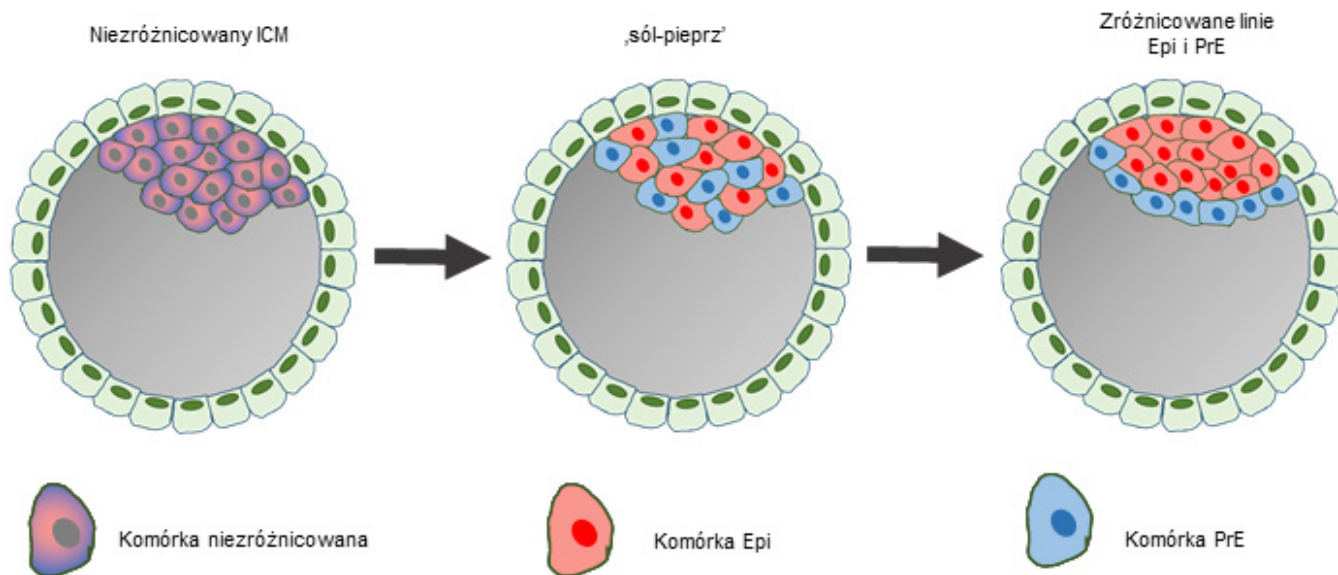
niezbędna jest aktywność czynników transkrypcyjnych specyficznych dla TE. Badania zarodków mysich wykazały kluczową rolę czynników transkrypcyjnych *CDX2* [67] i *GATA3* [50,68] w różnicowaniu TE. W zarodkach mysich pozbawionych genu *Cdx2* kawitacja początkowo przebiega w sposób prawidłowy, jednak po osiągnięciu stadium wczesnej blastocysty dalszy rozwój TE zostaje zahamowany i zarodki takie nie są zdolne do implantacji [67]. O ile w zarodkach mysich i bydłych *CDX2* wykrywane jest już na etapie moruli [67,69], to u innych badanych ssaków (człowieka, świni, królika) białko to pojawia się dopiero w TE na stadium blastocysty [70–75]. *GATA3* jest także czynnikiem transkrypcyjnym występującym specyficznie w TE w zarodkach myszy [50, 68], człowieka [52, 76], bydła [52,77,78] oraz konia [79].

Istotną rolę w różnicowaniu TE i ICM w zarodku myszy odgrywa wzajemne oddziaływanie czynników transkrypcyjnych *CDX2* i *OCT4* (ang. *Octamer-binding transcription factor 4*) [80]. *CDX2* i *OCT4* współwystępują w zarodku myszy w zewnętrznych komórkach na stadium moruli, a także w niektórych komórkach TE na stadium blastocysty [81,82], jednak poziom ekspresji *Oct4* ulega obniżeniu w komórkach TE, co jest konieczne dla ich prawidłowego różnicowania [67, 80]. W zarodkach bydła oraz niektórych innych gatunków ssaków obniżenie poziomu ekspresji *OCT4* nie jest konieczne dla prawidłowego różnicowania trofektodermy, gdyż w przeciwieństwie do myszy sekwencje regulatorowe tego genu nie zawierają obszaru pozwalającego na wyciszenie transkrypcji w TE [70]. W zarodkach ludzkich [83], bydłych [69, 84] oraz króliczych [85] wysoki poziom ekspresji *OCT4* utrzymuje się do stadium późnej blastocysty zarówno w ICM, jak i w TE, i nie ulega obniżeniu pomimo współekspresji z *CDX2*. W zarodkach bydłych stwierdzono także, że obniżenie ekspresji *CDX2* nie zwiększa ekspresji czynnika *OCT4* [70], a usunięcie genu *OCT4* powoduje równoczesne obniżenie ekspresji *CDX2* [86].

## DALSZE DECYZJE ROZWOJOWE - RÓŻNICOWANIE EPIBLASTU I ENDODERMY PIERWOTNEJ

W późniejszym rozwoju zarodka komórki ICM ulegają dalszemu różnicowaniu, wskutek czego powstają dwie kolejne linie komórkowe: endoderma pierwotna oraz epiblast. Endoderma pierwotna to linia pozazarodkowa, w dalszym rozwoju tworząca przede wszystkim pęcherzyk żółtkowy, chociaż pojedyncze komórki tej linii wchodzą także w skład jelita zarodka [87]. Pochodne PrE biorą także udział w indukowaniu osi symetrii zarodka we wczesnym rozwoju poimplantacyjnym [88]. Drugą linią komórkową powstającą z ICM jest epiblast – linia zarodkowa, która utworzy wszystkie tkanki ciała płodu oraz część błon płodowych.

Różnicowanie Epi i PrE poprzedzone jest przez okres, w którym komórki ICM nie są jeszcze wyspecjalizowane i we wszystkich obserwuje się obecność czynników transkrypcyjnych charakterystycznych zarówno dla Epi (NANOG), jak i PrE (*GATA6*) [89]. Taki wzorzec ekspresji zaobserwowano we wczesnych blastocystach wielu gatunków ssaków, w tym myszy [89,90], świni [91], królika [92], człowieka [93,94] i innych naczelnych [95]. Następnie w każdej komórce dochodzi do stopniowego wyciszenia ekspresji *Gata6* lub



**Rycina 3.** Różnicowanie epiblastu (Epi) i endodermy pierwotnej (PrE). Na etapie wczesnej blastocysty komórki ICM są niezróżnicowane i wykazują współekspresję czynników specyficznych dla Epi i PrE. Następnie komórki ICM ulegają różnicowaniu w kierunku Epi i PrE i na tym etapie ułożone są w sposób mozaikowy, nazywany 'sól-pieprz'. Na stadium późnej blastocysty komórki Epi i PrE ulegają sortowaniu w dwie warstwy, w taki sposób że PrE oddziela Epi od jamy blastocysty.

*Nanog*, oraz aktywacji ekspresji kolejnych czynników transkrypcyjnych charakterystycznych dla każdej linii. Zróżnicowane w ten sposób komórki prekursorowe PrE oraz komórki prekursorowe Epi ułożone są w ICM mozaikowo, co nazywamy układem sól-pieprz (ang. *salt and pepper*) (Ryc. 3). Kolejnym etapem różnicowania komórek w PrE i Epi jest determinacja losu komórek oraz ich segregacja przestrzenna, w wyniku czego komórki PrE znajdują się na powierzchni ICM, a Epi – w środku ICM, pomiędzy TE a PrE [96].

#### EPIBLAST - LINIA PLURIPOTENTNA

Na początku rozwoju blastomery bruzdkującego zarodka są totipotentne, co oznacza, że mają zdolność wytworzenia wszystkich trzech przedimplantacyjnych linii komórkowych, zarówno pozazarodkowych: TE i PrE, jak i zarodkowej linii Epi. Wraz z rozwojem zarodka komórki tracą totipotencję, uzyskując jednocześnie cechy charakterystyczne dla poszczególnych, bardziej zróżnicowanych linii. Komórki Epi uzyskują w wyniku tego procesu stan pluripotencji – możliwości wytworzenia trzech listków zarodkowych (endodermy, mezodermy oraz ektodermy), w tym komórek linii płciowej. Należy zwrócić uwagę, że epiblastem określa się komórki począwszy od prekursorów tej linii na stadium wczesnej blastocysty aż do wczesnego stadium poimplantacyjnego, do czasu gastrulacji. W przypadku myszy są to 4 dni rozwoju zarodka, ale u innych gatunków okres ten może trwać dłużej. W tym czasie zachodzą dalsze zmiany w potencji komórek. Komórki wczesnego epiblastu (u myszy na stadium późnej blastocysty) charakteryzują się naiwnym stanem pluripotencji (ang. *naive pluripotency*) – zachowują potencjalnie największe możliwości różnicowania, ale nie są jeszcze kompetentne do różnicowania w listki zarodkowe [97]. Komórki późnego epiblastu (u myszy na stadium cylindra zarodkowego) charakteryzuje natomiast pluripotencja ugruntowana (ang. *primed pluripotency*) - ko-

mórki te są już w stanie odpowiedzieć na sygnały indukujące ich różnicowanie w każdy z trzech listków zarodkowych [97]. Pluripotencja formatywna (ang. *formative pluripotency*) jest natomiast stanem przejściowym niezbędnym do przejścia komórek Epi ze stanu pluripotencji naiwnej do ugruntowanej [98]. Sugeruje się, że różnych stopni pluripotencji może być znacznie więcej i różnią się one w zależności od gatunku [99]. Różnice międzygatunkowe wynikać mogą z odmiennych ścieżek regulujących pluripotencję u każdego gatunku, ale także z różnic w regulacji transkrypcji genów, metabolizmu czy modyfikacji epigenetycznych [95,98,99].

To właśnie z pluripotentnych komórek epiblastu uzyskuje się zarodkowe komórki macierzyste (ES, ang. *embryonic stem cells*). Komórki te charakteryzują się utrzymaniem pluripotencji *in vitro*, przy jednoczesnym zachowaniu możliwości samoodnowy – zdolności do nieskończonej liczby podziałów komórkowych w warunkach *in vitro* bez utraty stanu niezróżnicowanego. Pierwsze komórki ES uzyskano z blastocysty myszy. Dokonali tego w 1981 roku Martin Evans i Matthew Kaufmann [100] oraz niezależnie Gail Martin [101]. Mimo intensywnych prac nad uzyskaniem komórek ES z zarodków innych gatunków, na ludzkie komórki ES trzeba było czekać prawie 2 dekady [102,103], a kolejne, szczurze komórki ES uzyskano po kolejnych 10 latach [104,105]. Do dziś nie uzyskano jednak z zarodków zwierząt gospodarskich (królika, krowy czy owcy) linii komórkowych charakteryzujących się pluripotencją naiwną. Fakt ten wskazuje na istotne różnice międzygatunkowe w mechanizmach różnicowania linii epiblastu oraz uzyskiwania i utrzymania stanu pluripotencji. Zagadnienia związane z uzyskiwaniem i charakterystyką linii ES zostały szerzej omówione w artykule autorstwa Zofii Madei w niniejszym numerze [106].

## ENDODERMA PIERWOTNA

W rozwoju przedimplantacyjnym ssaków mechanizmy utrzymania stanu pluripotencji i odpowiedniego wyjścia poszczególnych komórek ze stanu pluripotencji tj. różnicowania, są precyzyjnie kontrolowane (przestrzennie i czasowo) przez wzajemne oddziaływania sieci czynników transkrypcyjnych obecnych w komórce i szlaków sygnałowych, stymulowanych czynnikami zewnątrzkomórkowymi. Chociaż poszczególne elementy mechanizmów kontroli pluripotencji są podobne u wszystkich badanych do tej pory gatunków ssaków, zauważa się wiele różnic związanych z czasem występowania, funkcją oraz wzajemnym oddziaływaniem czynników transkrypcyjnych.

Badania mysich zarodków przedimplantacyjnych oraz komórek ES [107] wykazały obecność 9 czynników transkrypcyjnych, które mogą mieć kluczowy wpływ na rozwój i utrzymanie stanu pierwotnej pluripotencji i należą do nich: OCT4 (POU5f1), SOX2, NANOG, SALL4, KLF2, KLF4, ESRRB i TFCP2L1. Za różnicowanie komórek w kierunku linii epiblastu odpowiedzialne są przede wszystkim czynniki OCT4 [108,109], NANOG [110, 111] i SOX2 (ang. *Sex determining region Y box containing gene 2*) [112]. W zarodkach myszy markery te wykrywane są od stadium 8-komórkowego i lokalizują się w jądrach komórkowych wszystkich blastomerów, po czym w trakcie rozwoju ich synteza zostaje powoli wyciszana w komórkach zewnętrznych i utrzymuje się w komórkach ICM, a ostatecznie wykrywane są one jedynie w komórkach Epi [90,113,114]. U myszy inaktywacja obydwu alleli każdego z tych genów powoduje obumarcie zarodka na etapie okołoimplantacyjnym. Zarodki pozbawione genu *Oct4* są w stanie rozwinąć się do stadium blastocysty, jednak ICM takiego zarodka wykazuje obecność markerów charakterystycznych dla TE [108]. Pozbawienie zarodków czynnika SOX2 nie wpływa na różnicowanie się komórek ICM w kierunku Epi ani na zmianę poziomu ekspresji *Nanog*, ale powoduje zmniejszenie liczby komórek PrE w węzle zarodkowym i zwiększenie liczby komórek nie wykazujących markerów Epi ani PrE [115]. Pozbawienie zarodków czynnika *Nanog* nie wpływa na rozwój wczesnej blastocysty, jednak w dalszym rozwoju powoduje zablokowanie różnicowania pluripotentnej linii Epi, a w konsekwencji jej braku uniemożliwia także różnicowanie linii PrE [110,116–118]. Zauważono także, że obecność czynnika SALL4 (ang. *spalt-like transcription factor 4*) jest niezbędna w procesach różnicowania się TE:ICM oraz PrE z ICM [119].

Badania potwierdziły obecność czynnika transkrypcyjnego OCT4 u wielu gatunków ssaków m.in. w zarodkach ludzkich [83], bydłych [69,84], końskich [120], świńskich [121] oraz króliczych [85], przy czym jest on obecny zarówno w ICM, jak i w TE aż do stadium późnej blastocysty. Wydaje się, że czynnikiem bardziej specyficznym dla komórek Epi zarodków ssaków innych niż gryzoni jest SOX2. W blastocystyce świńskiej [122,123], końskiej [55] czy króliczej [92,124] jego obecność ogranicza się wyłącznie do komórek Epi i nie współwystępuje on z markerami TE na żadnym ze stadiów rozwojowych. W zarodkach bydłych obecność genu SOX2 wykryta została już na etapie 8-komórkowym, natomiast w 7-9 dniowej blastocystyce jego ekspresja ograniczona jest do komórek ICM [125,126].

Różnicowanie PrE także kontrolowane jest przez specyficzne czynniki transkrypcyjne. Jak już wcześniej wspomniano, u myszy różnicowanie PrE związane jest z wzajemnymi oddziaływaniami czynników GATA6 i NANOG [127]. Współwystępują one w każdej komórce zarodka od stadium 8-komórkowego [89] a następnie, w części komórek kierowanych na ścieżkę PrE, ekspresja *Gata6* prawdopodobnie wycisza ekspresję *Nanog* [127]. W zarodkach królika nie zaobserwowano jednak takiej zależności – chociaż ekspresja GATA6 ulega ograniczeniu do komórek prekursorowych PrE, to NANOG występuje we wszystkich komórkach ICM aż do czasu przestrzennej segregacji linii PrE i Epi [92]. Wraz z ograniczeniem ekspresji GATA6 do komórek prekursorowych PrE na stadium sól-pieprz, aktywacji w tych komórkach ulegają kolejne czynniki transkrypcyjne, przede wszystkim GATA4 i SOX17 (ang. *SRY-box containing gene 17*) [128]. Obecność SOX17 stwierdzono w PrE w zarodkach myszy [70], człowieka [94], królika [92], bydła [129] i świni [91], natomiast GATA4 w zarodkach myszy [130], człowieka [131] i bydła [132].

## ROLA SZLAKU FGF/MAPK W RÓŻNICOWANIU ENDODERMY PIERWOTNEJ I EPIBLASTU

W rozwoju przedimplantacyjnym zarodka myszy szlak FGF/MAPK (ścieżka czynnika wzrostu fibroblastów/kinazy białkowej aktywowanej mitogenem, ang. *fibroblast growth factor/mitogen-activated protein kinase*) ma wpływ na różnicowanie wszystkich trzech linii komórkowych: jest odpowiedzialny za różnicowanie komórek ICM w kierunku PrE, reguluje dojrzewanie komórek Epi oraz wspomaga proliferację komórek TE. Głównym czynnikiem aktywującym szlak FGF/MAPK w zarodku jest czynnik wzrostu FGF4 (ang. *fibroblast growth factor 4*) [133–135]. Czynnikiem ten jest produkowany przez komórki Epi i powoduje różnicowanie komórek ICM w kierunku PrE, głównie poprzez receptor FGFR1 [136].

W zarodkach mysich nadmiar FGF4 powoduje różnicowanie wszystkich komórek ICM jedynie w kierunku PrE [137], natomiast zablokowanie tego szlaku sygnałowego (przy użyciu inhibitorów FGFR 1 i 2 oraz inhibitora ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) powoduje różnicowanie komórek ICM jedynie w kierunku Epi [138]. Pośrednią, ważną rolę czynnika FGF4 jest utrzymanie odpowiedniej równowagi pomiędzy liczbą komórek Epi i PrE [139, 140]. Na stadium późnej blastocysty FGF4 działa na komórki Epi auto- oraz parakrynnie (na komórkę ma wpływ FGF4 produkowany przez nią samą oraz przez pozostałe komórki Epi), powodując utrzymanie stanu pluripotencji. Jednocześnie ten sam czynnik działa parakrynnie na komórki PrE, utrzymując komórki w stanie zróżnicowania. Szlak FGF/MAPK pełni również istotną rolę w różnicowaniu pierwszych linii komórkowych w zarodkach ssaków innych niż mysz, zaobserwowano jednak wyraźne różnice międzygatunkowe. U gatunków takich jak bydło [132], królik [92], świni [141] i owca pod wpływem wysokiego stężenia FGF2/FGF4 obserwuje się zwiększony udział komórek PrE w ICM. Jednocześnie u tych gatunków zablokowanie szlaku sygnałowego ERK nie eliminuje całkowicie komórek

PrE, chociaż powoduje zwiększenie udziału komórek Epi w ICM zarodków bydła [132] i świni [141], ale nie w zarodkach ludzkich [132]. Co ciekawe, zablokowanie receptorów FGFR nie wpływa na różnicowanie linii komórkowych w zarodkach człowieka, bydła, świni czy owcy.

## ROLA SZLAKU LIF/JAK/STAT W RÓŻNICOWANIU EPIBLASTU

Znaczenie ścieżki sygnałowej JAK/STAT (ścieżka kinazy Janus/białek przekazujących sygnał i aktywujących transkrypcję, ang. *Janus-activated kinase/signal transducer and activator of transcription*) w utrzymaniu pluripotencji komórek odkryto w trakcie badań nad tworzeniem linii mysich zarodkowych komórek macierzystych [142,143]. Zauważono wtedy, że zarodki bądź ICM poddane hodowli *in vitro* na warstwie komórek pochodzącej z mysich fibroblastów zarodkowych (MEF, ang. *mouse embryonic fibroblasts*) proliferowały zachowując swój pluripotentny charakter, co przyczyniło się do uzyskania stabilnej, samoodnawiającej się linii mysich komórek ES. Stało się to za sprawą czynnika LIF (ang. *Leukemia inhibitory factor*), który jest produkowany i wydzielany przez MEF i jest jednym z aktywatorów ścieżki JAK/STAT [144].

Mechanizm działania ścieżki JAK/STAT stymulowanej przez LIF w mysich komórkach ES zakłada, że czynnik ten wiąże się z glikoproteiną 130 (gp130) związaną z podjednostką receptora LIF (LIFR). Wiązanie LIF do LIFR aktywuje kinazę Janus (JAK) związaną z receptorem. Następnie, dzięki aktywacji JAK, dochodzi do fosforylacji gp130 i tworzenia się miejsca przyłączenia się dla obecnego w cytoplazmie komórki transduktora sygnału i aktywatora transkrypcji 3 (STAT3). Gdy STAT3 wiąże się z miejscem przyłączenia gp130 JAK fosforyluje przyłączony STAT3 (pSTAT3) i w tej formie tworzy homodimer, który przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z enhancerami genów, regulując ekspresję m. in. czynników transkrypcyjnych OCT4, SOX2 i NANOG [145] czy genów odpowiedzialnych za naiwny stan pluripotencji takich jak *Klf4* [146] i *Tfcp2l1* [147].

Badania zarodków mysich pozbawionych genu *Stat3* wykazały, że węzły zarodkowe blastocyst na stadium okołoinplantacyjnym mają mniejszą liczbę komórek, nie dochodzi w nich do segregacji komórek w kierunku linii Epi i PrE oraz że większość komórek ICM nie posiada markerów NANOG i OCT4 [148]. Co ciekawe, dodanie LIF do hodowli ludzkich komórek ES *in vitro* nie wpływa na aktywację genów pluripotencji, pomimo obecności elementów szlaku takich jak receptor LIF i gp130 oraz faktu, że dochodzi do indukcji szlaku i przemieszczania się pSTAT3 do jąder komórkowych. Sugeruje to, że mysie i ludzkie komórki ES wymagają odmiennych mechanizmów sygnalizacyjnych do regulacji ich pluripotencji [149].

W bydłych komórkach ES wykazano, że LIF stymuluje ścieżkę JAK/STAT, ale jest ona aktywna jedynie na początkowych etapach hodowli, i w przeciwieństwie do linii mysich komórek ES, u bydła czynnik ten nie podtrzymuje samoodnawiania komórek [150]. W zarodkach bydłych są obecne elementy ścieżki JAK/STAT takie jak *LIF*, *LIFR* i *GP130* [151], jednak badania nad suplementacją pożywki

hodowlanej czynnikiem LIF niejednoznacznie wykazały zarówno zwiększenie [152], obniżenie [153], jak i brak wpływu tego czynnika [154] na liczbę komórek ICM w bydłych blastocystach. Wykazano także, że hodowla bydłych zarodków z inhibitorami ścieżki JAK/STAT, a konkretnie z inhibitorami białek z rodziny JAK, powoduje obniżenie liczby komórek w ICM, nie wpływając przy tym na liczbę komórek TE, a hodowla z inhibitorem JAK1/2 wpływa na zmniejszenie liczby komórek ICM oraz obniża sygnał pSTAT3 w jądrach komórkowych ICM. Sugeruje to, że utrzymanie pluripotencji w bydłych zarodkach jest zależne od sygnałów JAK/STAT3, podobnie jak u myszy. W zarodkach świni wykazano, że ścieżka sygnałowa JAK/STAT jest kluczowa w rozwoju zarówno TE [141,155], jak i ICM [91]. Elementy szlaku sygnałowego JAK/STAT takie jak IL6 i 130gp są obecne w zarodkach świni w komórkach TE i ICM jednak szlak ten nie jest aktywowany przez LIF. Ponadto, inhibicja szlaku JAK/STAT przez inhibitor AZD1480 powoduje zaburzoną morfologię zarodka na etapie wczesnej blastocysty (brak zorganizowanego ICM i ekspresji SOX2), a blastocysty na późnym etapie rozwoju mają mniejszą liczbę komórek zarówno w ICM, jak i TE.

## PODSUMOWANIE

Różnicowanie zarodkowych i pozazarodkowych linii komórkowych w pierwszych dniach rozwoju zarodka ssaka jest kluczowe dla jego dalszego rozwoju po implantacji. Większość badań dotyczących tego procesu prowadzona jest na zarodkach mysich, które stanowią dogodny model dla badań z zakresu embriologii eksperymentalnej i genetyki. Jednak w ostatnich latach zauważalne jest zwiększone zainteresowanie biologią rozwoju innych gatunków ssaków, w tym zwierząt gospodarskich i dzikich, a także człowieka [178]. Co szczególnie istotne, badania te wykazują istotne różnice w molekularnych mechanizmach regulacji różnicowania pierwszych linii komórkowych u różnych gatunków ssaków, pomimo zachowanego wspólnego kształtu zarodka i obecności oraz podobnego działania wielu czynników transkrypcyjnych. Dalsze badania porównawcze pozwolą na zrozumienie zarówno różnic międzygatunkowych, jak i poznanie najistotniejszych mechanizmów rozwoju wspólnych dla zarodków ssaków.

## PIŚMIENNICTWO

1. Tarkowski AK (1959) Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 184: 1286-1287
2. Maemura M, Taketsuru H, Nakajima Y, Shao R, Kakihara A, Nogami J, Ohkawa Y, Tsukada Y-I (2021) Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage. *Sci Rep* 11: 11167. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90653-1>
3. Klimczewska K, Kaspercuk A, Suwińska A The regulative nature of mammalian embryos. *Curr Top Dev Biol Cell Fate Mamm Dev* 128: 105-149. doi: 10.1016/bs.ctdb.2017.10.010.
4. Ducibella T, Anderson E (1975) Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev Biol* 47: 45-58. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90262-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90262-6)
5. Ducibella T, Albertini DF, Anderson E, Biggers JD (1975) The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Dev Biol* 45: 231-250. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90063-9)
6. Soom AV, Boerjan ML, Bols PEJ, Vanroose G, Lein A, Coryn M, Kruif A de (1997) Timing of Compaction and Inner Cell Allocation in Bovine

- Embryos Produced in Vivo after Superovulation. *Biol Reprod* 57:1041–1049. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.1041>
7. Ledda S, Gonzalez-Bulnes A (2018) ET-Technologies in Small Ruminants, W: Niemann H, Wrenzycki C (red) *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies*. Springer International Publishing, Cham, str. 135–166
  8. Ziomek CA, Chatot CL, Manes C (1990) Polarization of blastomeres in the cleaving rabbit embryo. *J Exp Zool* 256: 84–91. <https://doi.org/10.1002/jez.1402560111>
  9. Reima I, Lehtonen E, Virtanen I, Fléchon J-E (1993) The cytoskeleton and associated proteins during cleavage, compaction and blastocyst differentiation in the pig. *Differentiation* 54: 35–45. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1993.tb00657.x>
  10. Iwata K, Yumoto K, Sugishima M, Mizoguchi C, Kai Y, Iba Y, Mio Y (2014) Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *J Assist Reprod Genet* 31: 421–426. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0195-2>
  11. Sefton M, Johnson MH, Clayton L, McConnell JM (1996) Experimental manipulations of compaction and their effects on the phosphorylation of uvomorulin. *Mol Reprod Dev* 44: 77–87. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199605\)44:1<77](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199605)44:1<77)
  12. Vestweber D, Gossler A, Boller K, Kemler R (1987) Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol* 124: 451–456. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90498-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90498-2)
  13. Ducibella T, Anderson E (1979) The effects of calcium deficiency on the formation of the zonula occludens and blastocoel in the mouse embryo. *Dev Biol* 73: 46–58. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(79\)90136-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(79)90136-2)
  14. Shirayoshi Y, Okada TS, Takeichi M (1983) The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 35: 631–638. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90095-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90095-8)
  15. De Paepe C, Cauffman G, Verloes A, Sterckx J, Devroey P, Tournaye H, Liebaers I, Van de Velde H (2013) Human trophoblast cells are not yet committed. *Hum Reprod Oxf Engl* 28: 740–749. <https://doi.org/10.1093/humrep/des432>
  16. Zakharova EE, Zaletova VV, Krivokharchenko AS (2014) Biopsy of human morula-stage embryos: outcome of 215 IVF/ICSI cycles with PGS. *PLoS One* 9: e106433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106433>
  17. Matsunari H, Watanabe M, Hasegawa K, Uchikura A, Nakano K, Umeyama K, Masaki H, Hamanaka S, Yamaguchi T, Nagaya M, Nishinakamura R, Nakauchi H, Nagashima H (2020) Compensation of Disabled Organogenesis in Genetically Modified Pig Fetuses by Blastocyst Complementation. *Stem Cell Rep* 14: 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.11.008>
  18. Suzuki H, Azuma T, Koyama H, Yang X (1999) Development of Cellular Polarity of Hamster Embryos during Compaction. *Biol Reprod* 61: 521–526. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.2.521>
  19. Barcroft LC, Hay-Schmidt A, Caveney A, Gilfoyle E, Overstrom EW, Hyttel P, Watson AJ (1998) Trophoblast differentiation in the bovine embryo: characterization of a polarized epithelium. *J Reprod Fertil* 114: 327–339. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1140327>
  20. Modina S, Leoni GG, Lodde V, Naitana S, Pirani S, Succu S, Berlinguer F, Luciano AM (2010) Involvement of E-cadherin in early in vitro development of adult and juvenile sheep embryos. *Reprod Fertil Dev* 22: 468–477. <https://doi.org/10.1071/RD09125>
  21. Anani S, Bhat S, Honma-Yamanaka N, Krawchuk D, Yamanaka Y (2014) Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Dev Camb Engl* 141: 2813–2824. <https://doi.org/10.1242/dev.107276>
  22. Maître J-L, Niwayama R, Turlier H, Nédélec F, Hiiragi T (2015) Pulsatile cell-autonomous contractility drives compaction in the mouse embryo. *Nat Cell Biol* 17: 849–855. <https://doi.org/10.1038/ncb3185>
  23. Maître J-L (2017) Mechanics of blastocyst morphogenesis. *Biol Cell* 109: 323–338. <https://doi.org/10.1111/boc.201700029>
  24. Albertini DF, Overstrom EW, Ebert KM (1987) Changes in the organization of the actin cytoskeleton during preimplantation development of the pig embryo. *Biol Reprod* 37: 441–451. <https://doi.org/10.1095/biolreprod37.2.441>
  25. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J (2006) Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 235: 2301–2314. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20844>
  26. Reeve WJ, Ziomek CA (1981) Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction. *J Embryol Exp Morphol* 62: 339–350
  27. Bretscher A (1983) Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *J Cell Biol* 97: 425–432. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.425>
  28. Dard N, Louvet-Vallée S, Santa-Maria A, Maro B (2004) Phosphorylation of ezrin on threonine T567 plays a crucial role during compaction in the mouse early embryo. *Dev Biol* 271: 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.03.024>
  29. Hanzel D, Reggio H, Bretscher A, Forte JG, Mangeat P (1991) The secretion-stimulated 80K phosphoprotein of parietal cells is ezrin, and has properties of a membrane cytoskeletal linker in the induced apical microvilli. *EMBO J* 10: 2363–2373
  30. Eckert JJ, McCallum A, Mears A, Rumsby MG, Cameron IT, Fleming TP (2004) Specific PKC isoforms regulate blastocoel formation during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 274: 384–401. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.027>
  31. Plusa B, Frankenberg S, Chalmers A, Hadjantonakis A-K, Moore CA, Papalopulu N, Papaioannou VE, Glover DM, Zernicka-Goetz M (2005) Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci* 118: 505–515. <https://doi.org/10.1242/jcs.01666>
  32. Vinot S, Le T, Ohno S, Pawson T, Maro B, Louvet-Vallée S (2005) Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol* 282: 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.001>
  33. Alarcon VB (2010) Cell polarity regulator PARD6B is essential for trophoblast formation in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 83: 347–358. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084400>
  34. Kidder GM, McLachlin JR (1985) Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 112: 265–275. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90397-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90397-5)
  35. Levy JB, Johnson MH, Goodall H, Maro B (1986) The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 95: 213–237
  36. Hirate Y, Hirahara S, Inoue K-I, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, Nakao K, Shimono A, Sasaki H (2013) Polarity-dependent distribution of angiotensin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr Biol CB* 23: 1181–1194. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.014>
  37. Pratt HP, Ziomek CA, Reeve WJ, Johnson MH (1982) Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J Embryol Exp Morphol* 70: 113–132
  38. Stephenson RO, Yamanaka Y, Rossant J (2010) Disorganized epithelial polarity and excess trophoblast cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Dev Camb Engl* 137: 3383–3391. <https://doi.org/10.1242/dev.050195>
  39. Betteridge KJ, Fléchon J-E (1988) The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology* 29: 155–187. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90038-6)
  40. Ducibella T, Ukena T, Karnovsky M, Anderson E (1977) Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Biol* 74: 153–167. <https://doi.org/10.1083/jcb.74.1.153>
  41. Skrzecz I, Karasiewicz J (1987) Decompaction and recompaction of mouse preimplantation embryos. *Roux Arch Dev Biol* 196: 397–400. <https://doi.org/10.1007/BF00375780>
  42. Chazaud C, Yamanaka Y (2016) Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Dev Camb Engl* 143: 1063–1074. <https://doi.org/10.1242/dev.128314>



43. Maître J-L, Turlier H, Illukkumbura R, Eismann B, Niwayama R, Nédélec F, Hiragi T (2016) Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature* 536: 344–348. <https://doi.org/10.1038/nature18958>
44. Tarkowski AK, Wróblewska J (1967) Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 18: 155–180
45. Hirate Y, Cockburn K, Rossant J, Sasaki H (2012) Tead4 is constitutively nuclear, while nuclear vs. cytoplasmic Yap distribution is regulated in preimplantation mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E3389–3390; author reply E3391–3392. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211810109>
46. Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, Sato H, Sawada A, Ota M, Nakao K, Sasaki H (2008) Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 125: 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.11.002>
47. 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 (2009) The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* 16: 398–410. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.003>
48. Yagi R, Kohn MJ, Karavanova I, Kaneko KJ, Vullhorst D, DePamphilis ML, Buonanno A (2007) Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Dev Camb Engl* 134: 3827–3836. <https://doi.org/10.1242/dev.010223>
49. Sasaki H (2017) Roles and regulations of Hippo signaling during preimplantation mouse development. *Dev Growth Differ* 59: 12–20. <https://doi.org/10.1111/dgd.12335>
50. Ralston A, Cox BJ, Nishioka N, Sasaki H, Chea E, Rugg-Gunn P, Guo G, Robson P, Draper JS, Rossant J (2010) Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* 137: 395–403. <https://doi.org/10.1242/dev.038828>
51. Frankenberg S (2018) Pre-gastrula Development of Non-eutherian Mammals. *Curr Top Dev Biol* 128: 237–266. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.013>
52. Gerri C, McCarthy A, Alanis-Lobato G, Demtschenko A, Bruneau A, Loubersac S, Fogarty NME, Hampshire D, Elder K, Snell P, Christie L, David L, Van de Velde H, Fouladi-Nashta AA, Niakan KK (2020) Initiation of a conserved trophectoderm program in human, cow and mouse embryos. *Nature* 587: 443–447. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2759-x>
53. Emura N, Takahashi K, Saito Y, Sawai K (2019) The necessity of TEAD4 for early development and gene expression involved in differentiation in porcine embryos. *J Reprod Dev* 65: 361–368. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-120>
54. Fujii T, Moriyasu S, Hirayama H, Hashizume T, Sawai K (2010) Aberrant expression patterns of genes involved in segregation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cell Reprogramming* 12: 617–625. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0017>
55. Iqbal K, Chitwood JL, Meyers-Brown GA, Roser JF, Ross PJ (2014) RNA-Seq Transcriptome Profiling of Equine Inner Cell Mass and Trophectoderm1. *Biol Reprod* 90: . <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.113928>
56. Johnson MH, Pickering SJ, Dhiman A, Radcliffe GS, Maro B (1988) Cytochemical organization during natural and prolonged mitosis of mouse 8-cell blastomeres. *Dev Camb Engl* 102: 143–158
57. Johnson MH, Ziomek CA (1981) The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24: 71–80
58. Johnson MH, Ziomek CA (1981) Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J Cell Biol* 91: 303–308. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.1.303>
59. Johnson MH, Ziomek CA (1983) Cell interactions influence the fate of mouse blastomeres undergoing the transition from the 16- to the 32-cell stage. *Dev Biol* 95: 211–218. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90019-2)
60. Gualtieri R, Santella L, Dale B (1992) Tight junctions and cavitation in the human pre-embryo. *Mol Reprod Dev* 32: 81–87. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080320113>
61. Nikas G, Ao A, Winston RM, Handyside AH (1996) Compaction and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biol Reprod* 55: 32–37. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.32>
62. Manejwala FM, Cragoe EJ, Schultz RM (1989) Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: role of extracellular sodium and chloride and possible apical routes of their entry. *Dev Biol* 133: 210–220. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(89\)90312-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(89)90312-6)
63. Manejwala FM, Schultz RM (1989) Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulation of sodium uptake by cAMP and possible involvement of cAMP-dependent protein kinase. *Dev Biol* 136: 560–563. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(89\)90282-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(89)90282-0)
64. van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A (1997) Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 47: 47–56
65. Barcroft LC, Offenberg H, Thomsen P, Watson AJ (2003) Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Dev Biol* 256: 342–354. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00127-6](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00127-6)
66. Marikawa Y, Alarcon VB (2012) Creation of trophectoderm, the first epithelium, in mouse preimplantation development. *Results Probl Cell Differ* 55: 165–184. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30406-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30406-4_9)
67. Strumpf D, Mao C-A, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Dev Camb Engl* 132: 2093–2102. <https://doi.org/10.1242/dev.01801>
68. Home P, Ray S, Dutta D, Bronshteyn I, Larson M, Paul S (2009) GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *J Biol Chem* 284: 28729–28737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016840>
69. Madeja ZE, Sosnowski J, Hryniewicz K, Warzych E, Pawlak P, Rozwadowska N, Plusa B, Lechniak D (2013) Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. *BMC Dev Biol* 13: 32. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-13-32>
70. Berg DK, Smith CS, Pearton DJ, Wells DN, Broadhurst R, Donnison M, Pfeffer PL (2011) Trophectoderm lineage determination in cattle. *Dev Cell* 20: 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.003>
71. Bou G, Liu S, Sun M, Zhu J, Xue B, Guo J, Zhao Y, Qu B, Weng X, Wei Y, Lei L, Liu Z (2017) CDX2 is essential for cell proliferation and polarity in porcine blastocysts. *Dev Camb Engl* 144: 1296–1306. <https://doi.org/10.1242/dev.141085>
72. Chen C-H, Xu J, Chang W-F, Liu C-C, Su H-Y, Chen YE, Du F, Sung L-Y (2012) Dynamic profiles of Oct-4, Cdx-2 and acetylated H4K5 in in-vivo-derived rabbit embryos. *Reprod Biomed Online* 25: 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.07.001>
73. Goissis MD, Cibelli JB (2014) Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development in vitro. *Mol Reprod Dev* 81: 962–970. <https://doi.org/10.1002/mrd.22415>
74. Kuijk EW, Du Puy L, Van Tol HTA, Oei CHY, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BAJ (2008) Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 237: 918–927. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21480>
75. Sakurai N, Takahashi K, Emura N, Fujii T, Hirayama H, Kageyama S, Hashizume T, Sawai K (2016) The Necessity of OCT-4 and CDX2 for Early Development and Gene Expression Involved in Differentiation of Inner Cell Mass and Trophectoderm Lineages in Bovine Embryos. *Cell Reprogramming* 18: 309–318. <https://doi.org/10.1089/cell.2015.0081>
76. Guo G, Stirparo GG, Strawbridge SE, Spindlow D, Yang J, Clarke J, Dattani A, Yanagida A, Li MA, Myers S, Özel BN, Nichols J, Smith A (2021) Human naive epiblast cells possess unrestricted lineage potential. *Cell Stem Cell* 28: 1040–1056.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.025>

77. Ozawa M, Sakatani M, Yao J, Shanker S, Yu F, Yamashita R, Wakabayashi S, Nakai K, Dobbs KB, Sudano MJ, Farmerie WG, Hansen PJ (2012) Global gene expression of the inner cell mass and trophoblast of the bovine blastocyst. *BMC Dev Biol* 12: 33. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-33>
78. Smith CS, Berg DK, Berg M, Pfeffer PL (2010) Nuclear transfer-specific defects are not apparent during the second week of embryogenesis in cattle. *Cell Reprogramming* 12: 699–707. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0040>
79. Iqbal K, Chitwood JL, Meyers-Brown GA, Roser JF, Ross PJ (2014) RNA-seq transcriptome profiling of equine inner cell mass and trophoblast. *Biol Reprod* 90: 61. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.113928>
80. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell* 123: 917–929. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.040>
81. Dietrich J-E, Hiiragi T (2007) Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Dev Camb Engl* 134: 4219–4231. <https://doi.org/10.1242/dev.003798>
82. Szczepańska K, Stańczuk L, Maleszewski M (2011) Oct4 protein remains in trophoblast until late stages of mouse blastocyst development. *Reprod Biol* 11: 145–156. [https://doi.org/10.1016/s1642-431x\(12\)60051-5](https://doi.org/10.1016/s1642-431x(12)60051-5)
83. Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Schöler H, Niemann H (2000) Expression Pattern of Oct-4 in Preimplantation Embryos of Different Species. *Biol Reprod* 63: 1698–1705. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1698>
84. Kuijk EW, Du Puy L, Van Tol HTA, Oei CHY, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BAJ (2008) Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev Dyn* 237: 918–927. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21480>
85. Kobolak J, Kiss K, Polgar Z, Mamo S, Rogel-Gaillard C, Tancos Z, Bock I, Baji AG, Tar K, Pirity MK, Dinnyes A (2009) Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol* 10: 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-88>
86. Sakurai N, Takahashi K, Emura N, Fujii T, Hirayama H, Kageyama S, Hashizume T, Sawai K (2016) The Necessity of OCT-4 and CDX2 for Early Development and Gene Expression Involved in Differentiation of Inner Cell Mass and Trophoblast Lineages in Bovine Embryos. *Cell Reprogramming* 18: 309–318. <https://doi.org/10.1089/cell.2015.0081>
87. Kwon GS, Viotti M, Hadjantonakis A-K (2008) The endoderm of the mouse embryo arises by dynamic widespread intercalation of embryonic and extraembryonic lineages. *Dev Cell* 15: 509–520. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.017>
88. Thomas P, Beddington R (1996) Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr Biol* 6: 1487–1496. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(96\)00753-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(96)00753-1)
89. Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis A-K (2008) Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 135: 3081–3091. <https://doi.org/10.1242/dev.021519>
90. Dietrich J-E, Hiiragi T (2007) Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* 134: 4219–4231. <https://doi.org/10.1242/dev.003798>
91. Ramos-Ibeas P, Sang F, Zhu Q, Tang WWC, Withey S, Klich D, Wood L, Loose M, Surani MA, Alberio R (2019) Pluripotency and X chromosome dynamics revealed in pig pre-gastrulating embryos by single cell analysis. *Nat Commun* 10: 500. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08387-8>
92. Piliszek A, Madeja ZE, Plusa B (2017) Suppression of ERK signalling abolishes primitive endoderm formation but does not promote pluripotency in rabbit embryo. *Development* 144: 3719–3730. <https://doi.org/10.1242/dev.156406>
93. Blakeley P, Fogarty NME, del Valle I, Wamaitha SE, Hu TX, Elder K, Snell P, Christie L, Robson P, Niakan KK (2015) Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Dev Camb Engl* 142: 3151–3165. <https://doi.org/10.1242/dev.123547>
94. Niakan KK, Eggan K (2013) Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Dev Biol* 375: 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.008>
95. Boroviak T, Loos R, Lombard P, Okahara J, Behr R, Sasaki E, Nichols J, Smith A, Bertone P (2015) Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev Cell* 35: 366–382. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.011>
96. Gardner RL, Rossant J (1979) Investigation of the fate of 4 5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *Development* 52: 141–152
97. Nichols J, Smith A (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4: 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>
98. Smith A (2017) Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Dev Camb Engl* 144: 365–373. <https://doi.org/10.1242/dev.142679>
99. Savatier P, Osteil P, Tam PPL (2017) Pluripotency of embryo-derived stem cells from rodents, lagomorphs, and primates: Slippery slope, terrace and cliff. *Stem Cell Res* 19: 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.01.008>
100. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
101. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634–7638
102. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
103. Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13726–13731. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13726>
104. Blair K, Leitch HG, Mansfield W, Dumeau C-É, Humphreys P, Smith AG (2012) Culture parameters for stable expansion, genetic modification and germline transmission of rat pluripotent stem cells. *Biol Open* 1: 58–65. <https://doi.org/10.1242/bio.2011029>
105. Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying Q-L, Smith A (2008) Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135: 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.007>
106. Madeja ZE (2021) Czynniki warunkujące pluripotencję - uzyskiwanie stabilnych ESC u zwierząt. *Postępy Biochem, bieżący numer*
107. Dunn S-J, Martello G, Yordanov B, Emmott S, Smith AG (2014) Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science* 344: 1156–1160. <https://doi.org/10.1126/science.1248882>
108. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A (1998) Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 95: 379–391. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81769-9)
109. Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344: 435–439. <https://doi.org/10.1038/344435a0>
110. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631–642. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00393-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00393-3)
111. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643–655

112. Avilion AA (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17: 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
113. Albert M, Peters AH (2009) Genetic and epigenetic control of early mouse development. *Curr Opin Genet Dev* 19: 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.03.004>
114. Szczepanska K, Stanczuk L, Maleszewski M (2011) Isolated mouse inner cell mass is unable to reconstruct trophectoderm. *Differentiation* 82: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.04.001>
115. Wicklow E, Blij S, Frum T, Hirate Y, Lang RA, Sasaki H, Ralston A (2014) HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS Genet* 10: e1004618. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004618>
116. Frankenberg S, Gerbe F, Bessonard S, Belville C, Pouchin P, Bardot O, Chazaud C (2011) Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev Cell* 21: 1005–1013. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.019>
117. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I, Smith A (2009) Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138: 722–737. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.039>
118. Messerschmidt DM, Kemler R (2010) Nanog is required for primitive endoderm formation through a non-cell autonomous mechanism. *Dev Biol* 344: 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.04.020>
119. Elling U, Klases C, Eisenberger T, Anlag K, Treier M (2006) Murine inner cell mass-derived lineages depend on *Sall4* function. *Proc Natl Acad Sci* 103: 16319–16324. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607884103>
120. Choi YH, Harding HD, Hartman DL, Obermiller AD, Kurosaka S, McLaughlin KJ, Hinrichs K (2009) The uterine environment modulates trophectodermal POU5F1 levels in equine blastocysts. *Reproduction* 138: 589–599. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0394>
121. Blomberg LA, Schreier LL, Talbot NC (2008) Expression analysis of pluripotency factors in the undifferentiated porcine inner cell mass and epiblast during in vitro culture. *Mol Reprod Dev* 75: 450–463. <https://doi.org/10.1002/mrd.20780>
122. Hall VJ, Christensen J, Gao Y, Schmidt MH, Hyttel P (2009) Porcine pluripotency cell signaling develops from the inner cell mass to the epiblast during early development. *Dev Dyn* 238: 2014–2024. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22027>
123. Liu S, Bou G, Sun R, Guo S, Xue B, Wei R, Cooney AJ, Liu Z (2015) Sox2 is the faithful marker for pluripotency in pig: Evidence from embryonic studies: SOX2 is the Faithful Marker for Pluripotency in Pig. *Dev Dyn* 244: 619–627. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24248>
124. Tánco Z, Bock I, Nemes C, Kobolák J, Dinnyés A (2015) Cloning and characterization of rabbit POU5F1, SOX2, KLF4, C-MYC and NANOG pluripotency-associated genes. *Gene* 566: 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.034>
125. Goissis MD, Cibelli JB (2014) Functional Characterization of SOX2 in Bovine Preimplantation Embryos. *Biol Reprod* 90: 30. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.111526>
126. Ozawa M, Sakatani M, Yao J, Shanker S, Yu F, Yamashita R, Wakabayashi S, Nakai K, Dobbs KB, Sudano M, Farmerie WG, Hansen PJ (2012) Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. *BMC Dev Biol* 12: 33. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-33>
127. Bessonard S, De Mot L, Gonze D, Barriol M, Dennis C, Goldbeter A, Dupont G, Chazaud C (2014) Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Dev Camb Engl* 141: 3637–3648. <https://doi.org/10.1242/dev.109678>
128. Artus J, Piliszek A, Hadjantonakis A-K (2011) The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: Sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev Biol* 350: 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.007>
129. Negrón-Pérez VM, Zhang Y, Hansen PJ (2017) Single-cell gene expression of the bovine blastocyst. *Reprod Camb Engl* 154: 627–644. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0345>
130. Morrisey EE, Musco S, Chen MYZ, Lu MM, Leiden JM, Parmacek MS (2000) The Gene Encoding the Mitogen-responsive Phosphoprotein Dab2 Is Differentially Regulated by GATA-6 and GATA-4 in the Visceral Endoderm. *J Biol Chem* 275: 19949–19954. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001331200>
131. Roode M, Blair K, Snell P, Elder K, Marchant S, Smith A, Nichols J (2012) Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Dev Biol* 361: 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.030>
132. Kuijk EW, van Tol LTA, Van de Velde H, Wubbolts R, Welling M, Geijsen N, Roelen BAJ (2012) The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Dev Camb Engl* 139: 871–882. <https://doi.org/10.1242/dev.071688>
133. Krawchuk D, Honma-Yamanaka N, Anani S, Yamanaka Y (2013) FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Dev Biol* 384: 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.09.023>
134. Kang M, Piliszek A, Artus J, Hadjantonakis A-K (2013) FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Dev Camb Engl* 140: 267–279. <https://doi.org/10.1242/dev.084996>
135. Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M (1995) Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 267: 246–249. <https://doi.org/10.1126/science.7809630>
136. Kang M, Garg V, Hadjantonakis A-K (2017) Lineage establishment and progression within the inner cell mass of the mouse blastocyst requires FGFR1 and FGFR2. *Dev Cell* 41: 496–510.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.003>
137. Yamanaka Y, Lanner F, Rossant J (2010) FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Dev Camb Engl* 137: 715–724. <https://doi.org/10.1242/dev.043471>
138. Nichols J, Silva J, Roode M, Smith A (2009) Suppression of Erk signaling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Dev Camb Engl* 136: 3215–3222. <https://doi.org/10.1242/dev.038893>
139. Saiz N, Williams KM, Seshan VE, Hadjantonakis A-K (2016) Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst. *Nat Commun* 7: 13463. <https://doi.org/10.1038/ncomms13463>
140. Saiz N, Mora-Bitria L, Rahman S, George H, Herder JP, García-Ojalvo J, Hadjantonakis A-K (2020) Growth factor-mediated coupling between lineage size and cell fate choice underlies robustness of mammalian development. *bioRxiv* 2019.12.27.889006. <https://doi.org/10.1101/2019.12.27.889006>
141. Rodríguez A, Allegrucci C, Alberio R (2012) Modulation of pluripotency in the porcine embryo and iPSC cells. *PLoS One* 7: e49079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049079>
142. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336: 688–690. <https://doi.org/10.1038/336688a0>
143. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336: 684–687. <https://doi.org/10.1038/336684a0>
144. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 12: 2048–2060. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.2048>
145. Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh Y-H, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung W-K, Clarke ND, Wei C-L, Ng H-H (2008) Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* 133: 1106–1117. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.043>
146. Stuart HT, van Oosten AL, Radziszewska A, Martello G, Miller A, Dietmann S, Nichols J, Silva JCR (2014) NANOG amplifies

- STAT3 activation and they synergistically induce the naive pluripotent program. *Curr Biol* 24: 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.040>
147. Ye S, Li P, Tong C, Ying Q-L (2013) Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. *EMBO J* 32: 2548–2560. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.175>
  148. Do DV, Ueda J, Messerschmidt DM, Lorthongpanich C, Zhou Y, Feng B, Guo G, Lin PJ, Hossain MZ, Zhang W, Moh A, Wu Q, Robson P, Ng HH, Poellinger L, Knowles BB, Solter D, Fu X-Y (2013) A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NA-NOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes Dev* 27: 1378–1390. <https://doi.org/10.1101/gad.221176.113>
  149. Dahéron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Lensch WM, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ (2004) LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 22: 770–778. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-770>
  150. Madeja ZE, Hryniewicz K, Orsztynowicz M, Pawlak P, Perkowska A (2015) WNT/ $\beta$ -catenin signaling affects cell lineage and pluripotency-specific gene expression in bovine blastocysts: prospects for bovine embryonic stem cell derivation. *Stem Cells Dev* 24: 2437–2454. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0053>
  151. Eckert J, Niemann H (1998) mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Mol Hum Reprod* 4: 957–965. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.10.957>
  152. Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Bosch P, Hollet BR, Lott JD, Brackett BG (2003) Effect of leukemia inhibitory factor on bovine embryos produced in vitro under chemically defined conditions. *Theriogenology* 59: 1751–1763. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01258-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01258-X)
  153. Vejlsted M, Avery B, Gjørret JO, Maddox-Hyttel P (2005) Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on in vitro produced bovine embryos and their outgrowth colonies. *Mol Reprod Dev* 70: 445–454. <https://doi.org/10.1002/mrd.20221>
  154. Rodríguez A, De Frutos C, Díez C, Caamaño JN, Facal N, Duque P, García-Ochoa C, Gómez E (2007) Effects of human versus mouse leukemia inhibitory factor on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* 67: 1092–1095. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.015>
  155. Hall VJ, Christensen J, Gao Y, Schmidt MH, Hyttel P (2009) Porcine pluripotency cell signaling develops from the inner cell mass to the epiblast during early development. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 238: 2014–2024. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22027>
  156. Quinn P, Horstman FC (1998) Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo in vitro? *Hum Reprod Oxf Engl* 13 Suppl 4: 173–183. [https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl\\_4.173](https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_4.173)
  157. Ziomek CA, Johnson MH (1980) Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell* 21: 935–942. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90457-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90457-2)
  158. Ducibella T, Albertini DF, Anderson E, Biggers JD (1975) The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Dev Biol* 45: 231–250. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90063-9)
  159. Finn CA, McLaren A (1967) A study of the early stages of implantation in mice. *Reproduction* 13: 259–267. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0130259>
  160. Hamilton WJ (1946) A previllous human embryo. *J Anat* 80: 215
  161. Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE (1981) The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 141: 408–416. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(81\)90603-7](https://doi.org/10.1016/0002-9378(81)90603-7)
  162. Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM (1971) Human Blastocysts grown in Culture. *Nature* 229: 132–133. <https://doi.org/10.1038/229132a0>
  163. Hertig AT, Rock J, Adams EC, Mulligan WJ (1954) On the Preimplantation Stages of the Human Ovum: A Description of Four Normal and Four Abnormal Specimens Ranging from the Second to the Fifth Day of Development. *Carnegie Inst Wash Publ* 603, *Contrib Embryol* 35: 199–220
  164. Hertig AT, Rock J, Adams EC (1956) A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat* 98: 435–493. <https://doi.org/10.1002/aja.1000980306>
  165. Bo G, Mapletoft R (2013) Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod* 10: 344–348
  166. Koyama H, Suzuki H, Yang X, Jiang S, Foote RH (1994) Analysis of polarity of bovine and rabbit embryos by scanning electron microscopy. *Biol Reprod* 50: 163–170
  167. Wathes DC, Wooding FB (1980) An electron microscopic study of implantation in the cow. *Am J Anat* 159: 285–306. <https://doi.org/10.1002/aja.1001590305>
  168. Deshmukh RS, Østrup O, Strejcek F, Vejlsted M, Lucas-Hahn A, Petersen B, Li J, Callesen H, Niemann H, Hyttel P (2012) Early Aberrations in Chromatin Dynamics in Embryos Produced Under In Vitro Conditions. *Cell Reprogramming* 14: 225–234. <https://doi.org/10.1089/cell.2011.0069>
  169. Dantzer V (1985) Electron microscopy of the initial stages of placenta in the pig. *Anat Embryol (Berl)* 172: 281–293. <https://doi.org/10.1007/BF00318976>
  170. Bindon BM (1971) Systematic study of preimplantation stages of pregnancy in the sheep. *Aust J Biol Sci* 24: 131–147
  171. Bettencourt EMV, Bettencourt CMV, Chagas e Silva JN, Ferreira P, Oliveira E, Romão R, Rocha A, Sousa M (2015) Ultrastructural characterization of in vivo-produced ovine morulae and blastocysts. *Zygote Camb Engl* 23: 583–593. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000264>
  172. Calarco PG, McLaren A (1976) Ultrastructural observations of preimplantation stages of the sheep. *J Embryol Exp Morphol* 36: 609–622
  173. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC (2004) Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reprod Camb Engl* 128: 657–668. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00398>
  174. García ML, Blasco A, Argente MJ (2016) Embryologic changes in rabbit lines selected for litter size variability. *Theriogenology* 86: 1247–1250. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.065>
  175. Gamow E, Daniel JC (1970) Fluid transport in the rabbit blastocyst. *Wilhelm Roux Arch Entwicklunsgsmechanik Org* 164: 261–278. <https://doi.org/10.1007/BF00582038>
  176. Enders AC, Schlafke S (1971) Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit. *Am J Anat* 132: 219–230. <https://doi.org/10.1002/aja.1001320208>
  177. Nishimura M (2001) Timing of implantation in New Zealand White rabbits. *Congenit Anom* 41: 198–203. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2001.tb00833.x>
  178. Plusa B, Piliszek A (2020) Common principles of early mammalian embryo self-organisation. *Development* 147: dev183079. <https://doi.org/10.1242/dev.183079>

# Differentiation of first cell lineages in mammalian embryos - interspecies similarities and differences

Katarzyna Filimonow<sup>1</sup>, Anna Chołoniewska<sup>2</sup>, mgr Katarzyna Michniak<sup>1</sup>, Anna Piliszek<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Department of Experimental Embryology, Institute of Genetics and Animal Biotechnology of the Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec

<sup>2</sup>Laboratory for Cell Research and Application, Center for Preclinical Research and Technology, Medical University of Warsaw

✉corresponding author: a.piliszek@igbzpan.pl

**Keywords:** epiblast, preimplantation development, primitive endoderm, trophoctoderm

## ABSTRACT

The embryonic development of placental mammals takes place inside the mother's womb, which requires the formation of appropriate supportive structures by both the mother's organism and the developing embryo. The first stages of mammalian embryonic development, preceding implantation, are the period of differentiation of the first cell lineages - epiblast (which will give rise to the embryo proper), and extra-embryonic lineages: trophoctoderm (responsible for implantation and formation of the placenta) and primitive endoderm (giving rise to the yolk sac). Their differentiation is necessary for further development, and is a common feature of the development of all placental mammals, but the timing and molecular mechanisms responsible for these processes differ between mammalian species.

