

Ориентиры эмбрионов на ранних стадиях развития

а-яйцо вскоре после оплодотворения, с конусом (FC) и полярным тельцем (PB);
б-стадия сближения пронуклеусов (fp, mp);
с-стадия 3-х бластомеров;
д-бластоциста с разметкой анимального (A) и вегетативного (V) полюсов и частей (эмбриональной Em и бластоцеля)

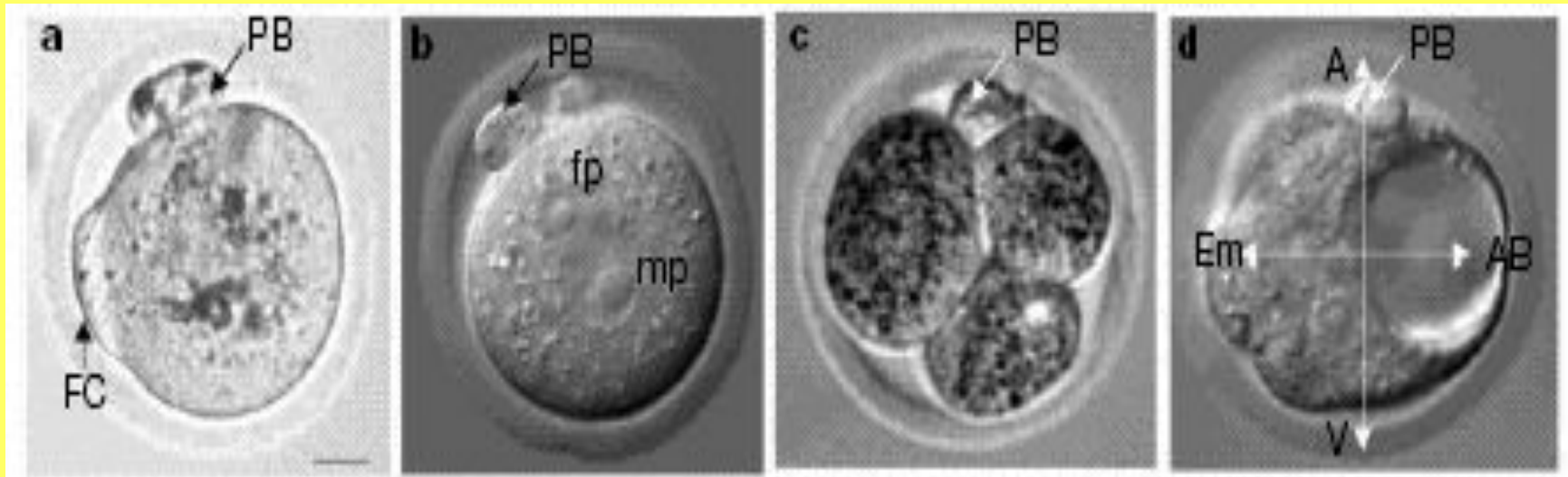
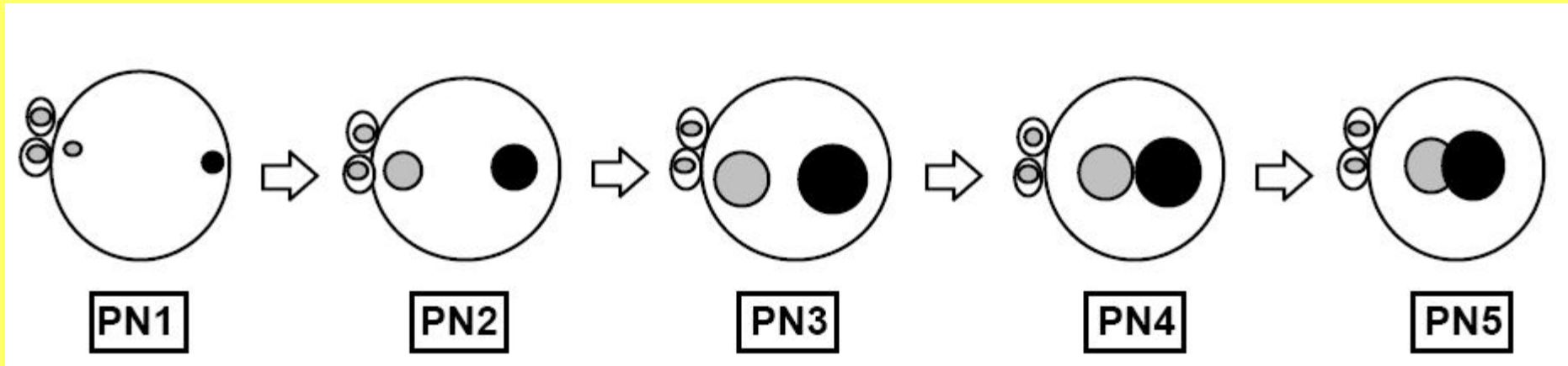
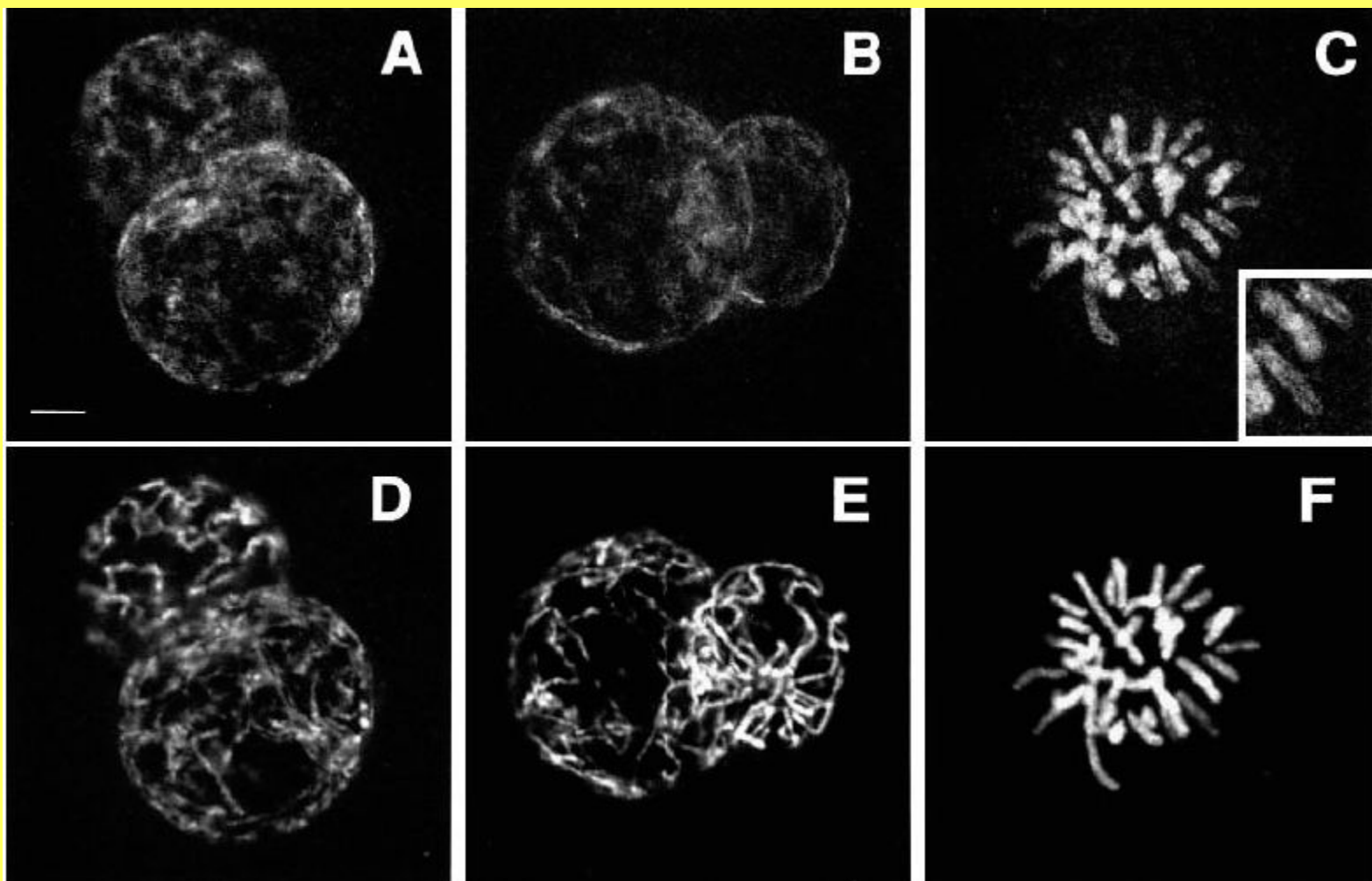


Схема развития пронуклеусов и образование зиготического генома мыши
(Adenot et al., 1997)



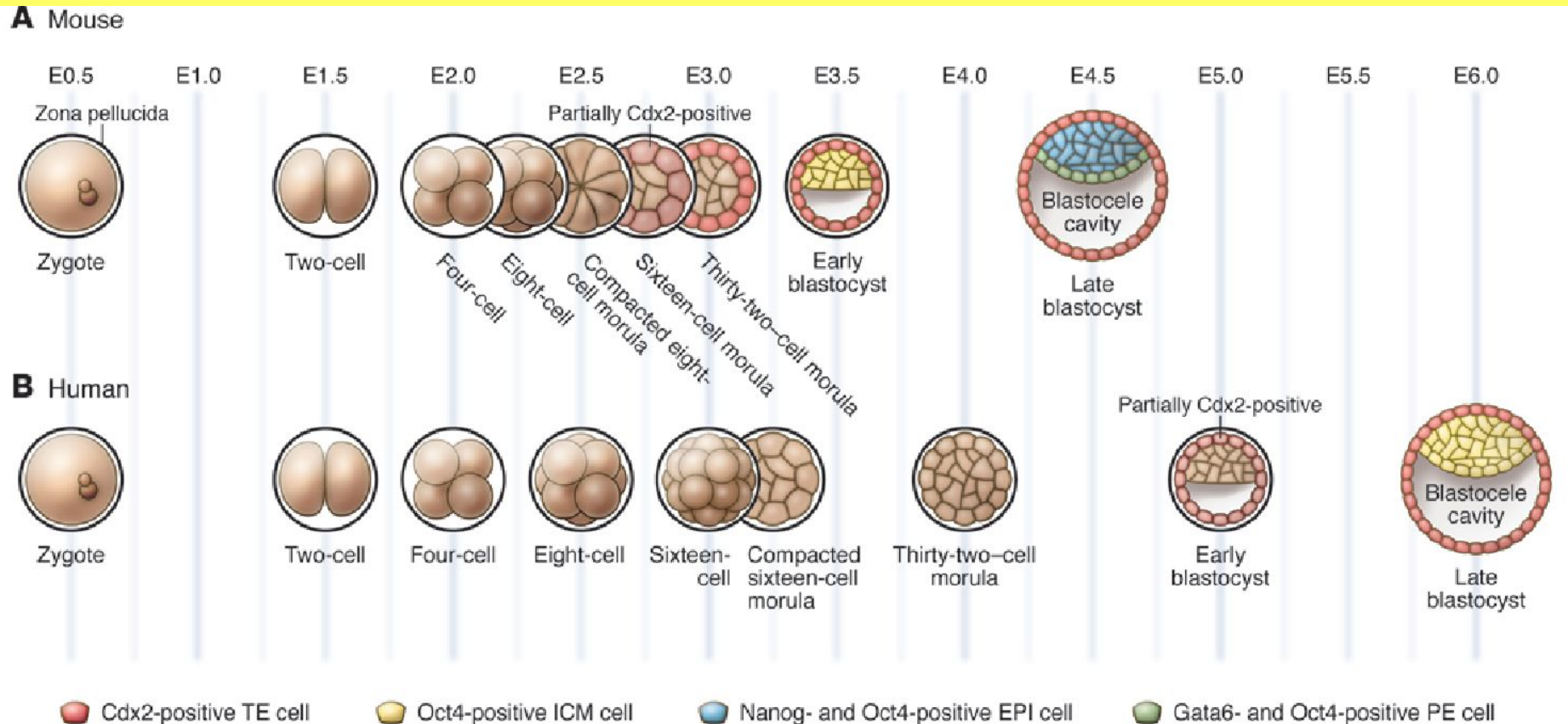
Мужской (серый) и женский (черный) пронуклеусы. P1-небольшой мужской на периферии эмбриона; P2- он увеличивается в размере и начинается миграция его к центру; P3 –продолжается движение к центру; P4 – сближение пронуклеусов; P5 –процесс кариогамии (слияние пронуклеусов-сингамия)

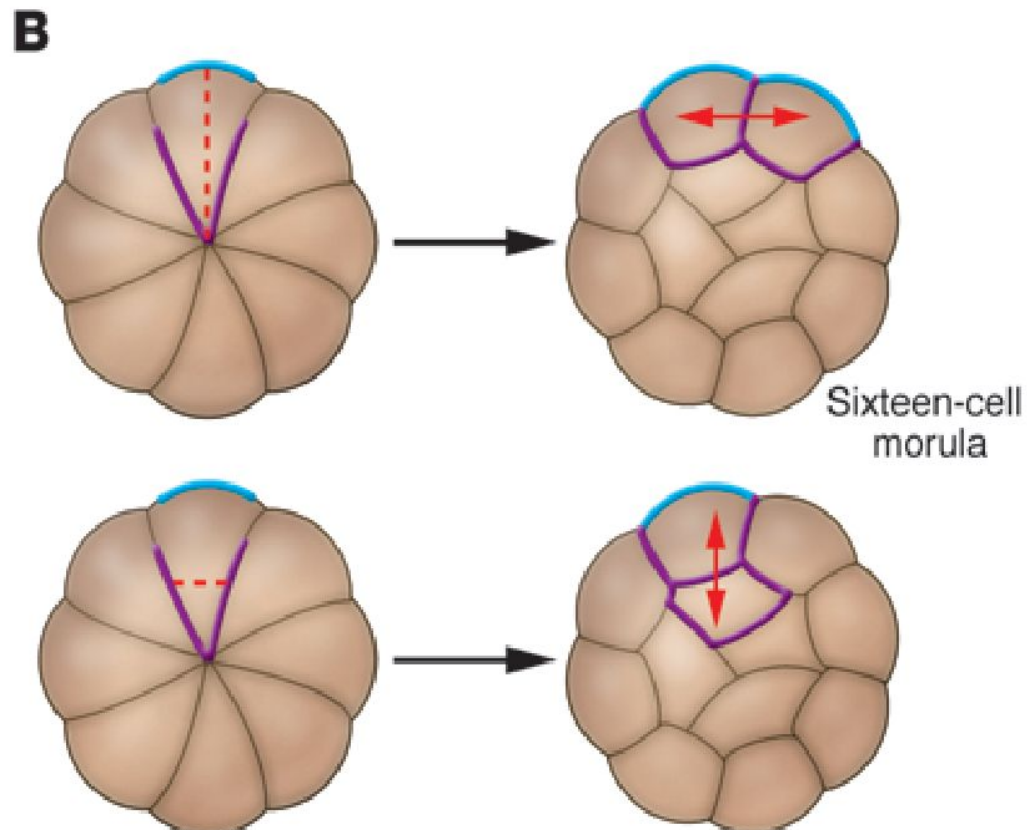
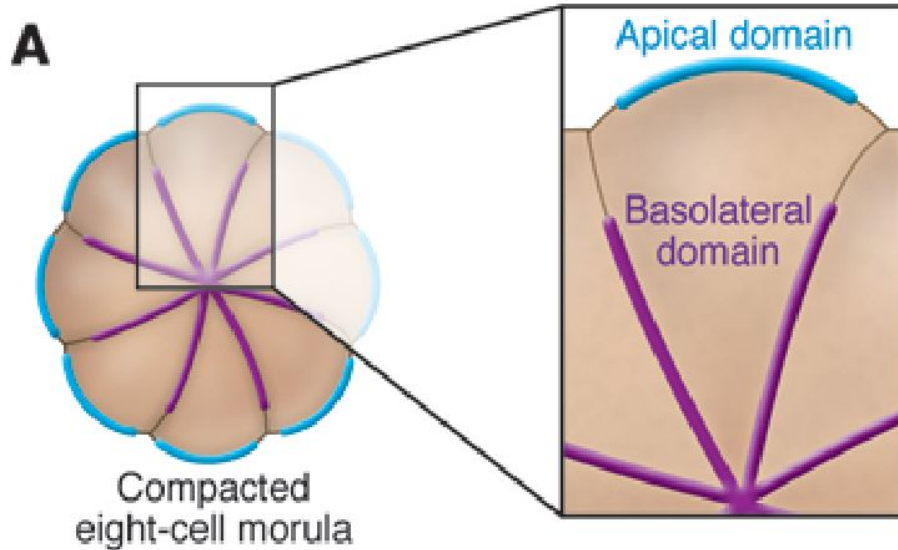


Сингамия – слияние пронуклеусов (А,В,Д,Е) и первый митоз (С,Ф).
А-С – иммунофлуоресценция гистона Н4-Л5;
Д-Ф – окраска пропидиум-иодидом (Adenot et al. 1997).

Стадии развития предимплантационных эмбрионов человека и мыши.

A – после 3-х делений-дроблений зиготы 8-ми клеточный эмбрион подвергается компактизации. На этой стадии происходит разделение клеток на две категории: внутренняя и внешняя части. На стадии 32-клетки происходит формирование бластоцеля. *Cdx2* активируется во внешнем слое клеток, будущая трофэктодерма, а экспрессия *Oct4* ограничена ВКМ на стадии ранней бластоцисты. В поздней бластоцисты клетки ВКМ позитивны по *Oct4* и *Nanog*, а примитивная эктодерма позитивна по *Gata6*.
B - распределение *GDX2*, *OCT4*, *NANOG* и *GATA6* не определено до стадии бластоцисты человека (**Cockburn and Rossant 2010**)





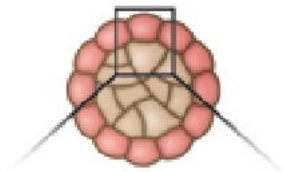
Поляризация предимплантационных эмбрионов мыши.

A – 8-ми клеточной стадии все бластомеры поляризованы вдоль оси клеточного контакта, формируя апикальный и базально-латеральный домены.

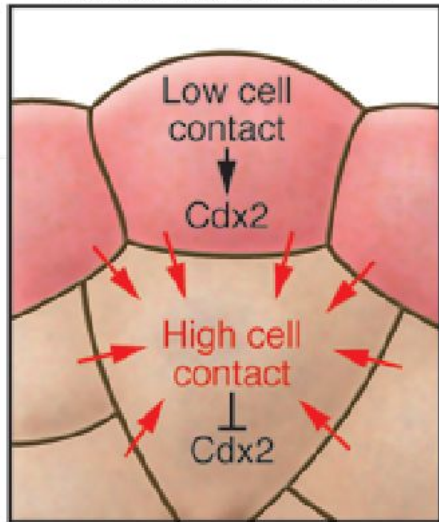
B – при переходе от 8-ми к 16-ти клеточной стадии бластомеры делятся либо параллельно inside-outside оси, давая 2 внешние полярные клетки, либо перпендикулярно ей давая одну внешнюю полярную и одну неполярную клетку внутри. Таким образом, формируются 2 популяции клеток – внешние полярные и внутренние неполярные. Эти два типа деления проявляются при переходе от 16-ти к 32-м клеточным эмбрионам (**Cockburn and Rossant 2010**).

Важнейшие события с момента оплодотворения:

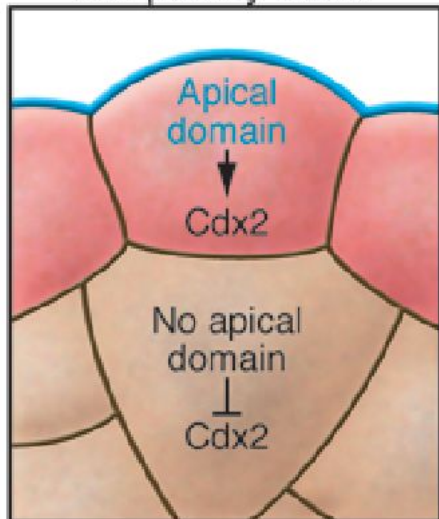
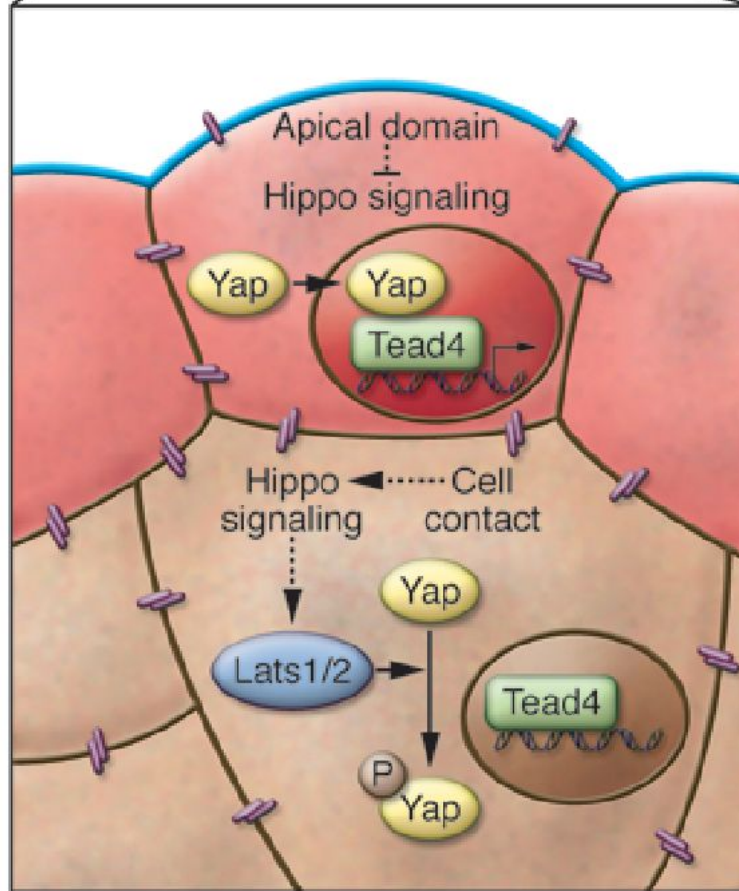
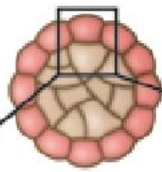
1. Синтез белка происходит на материнских мРНК;
2. Зиготические гены активируются в конце первого деления-дробления и усиливается на 2-клеточной стадии;
у человека при переходе 4-х к 8-ми клеточной стадии;
3. Компактизация реализуется в период от 8-ми до 32-х клеточной стадии;
E-cadherin – главный компонент «склеивающей» функции между бластомерами при участии внутриклеточных партнеров - α - и β -catenin;
4. Поляризация сопровождающая компактизацию характеризуется движением ядер в базальнолатеральный район, а десмосомы ранее распределенные равномерно по цитоплазме начинают накапливаться в апикальном конце;
5. Мембранные белки полярности Par3, Par6 и PKC локализуются в апикальном домене, а Par1 и Lgl (lethal giant larva homolog) в базальнолатеральном;
6. Сформированные две популяции клеток имеют разную дальнейшую судьбу – внешние клетки эмбриона образуют трофэктодерму, тогда как клетки внутри дают начало внутренней клеточной массе (ВКМ), которая дивергирует на клетки эпибласта и примитивной эктодермы;
7. На стадии 32-х клеток начинается формирование бластоцеля-полости наполненной жидкостью.

A

Inside-outside model

**B**

Cell polarity model

**C**

Модели образования ТЭ.

A – внутренние и внешние клетки имеют разное количество контактов, что определяет различия в Экспрессии транскрипционных факторов (ТФ).

B – присутствие или отсутствие апикального Домена определяет разные наборы ТФ.

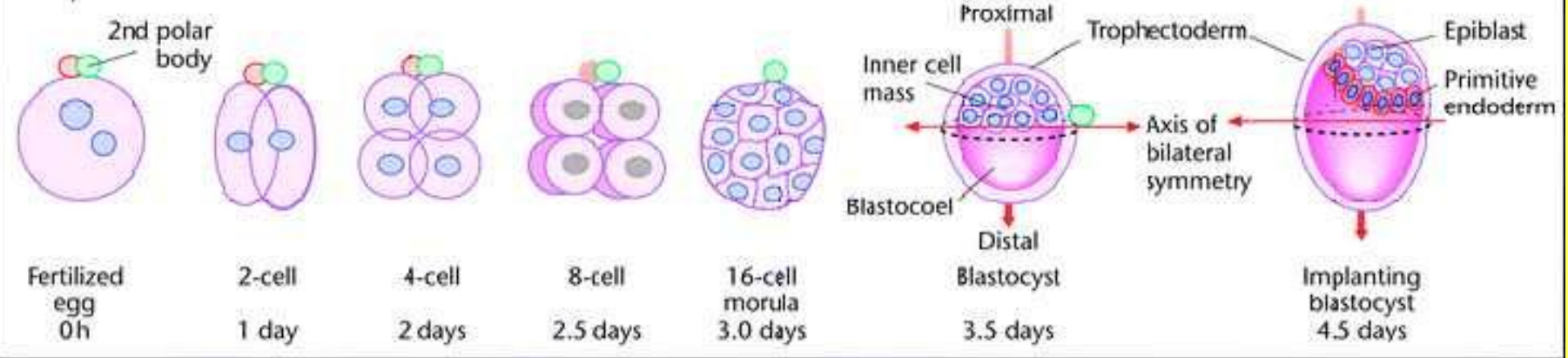
C – на 8-ми клеточной стадии *Lats 1/2* киназы фосфорилируют Yap во внутренних клетках препятствуя попаданию его в ядро. Без активации *Yap*, *Tead4* не может активировать *Cdx2* во внешних клетках. В этих клетках *Lat1* и *Lat2* неактивны и *Yap* достигает ядра и активирует *Cdx2*. Результатом является коммитирование ТЭ на стадии 32-х клеток (**Cockburn and**

Коммитирование апикальных клеток к дифференцировке в ТЭ, первое реальное событие дифференцировки в развитии млекопитающих.

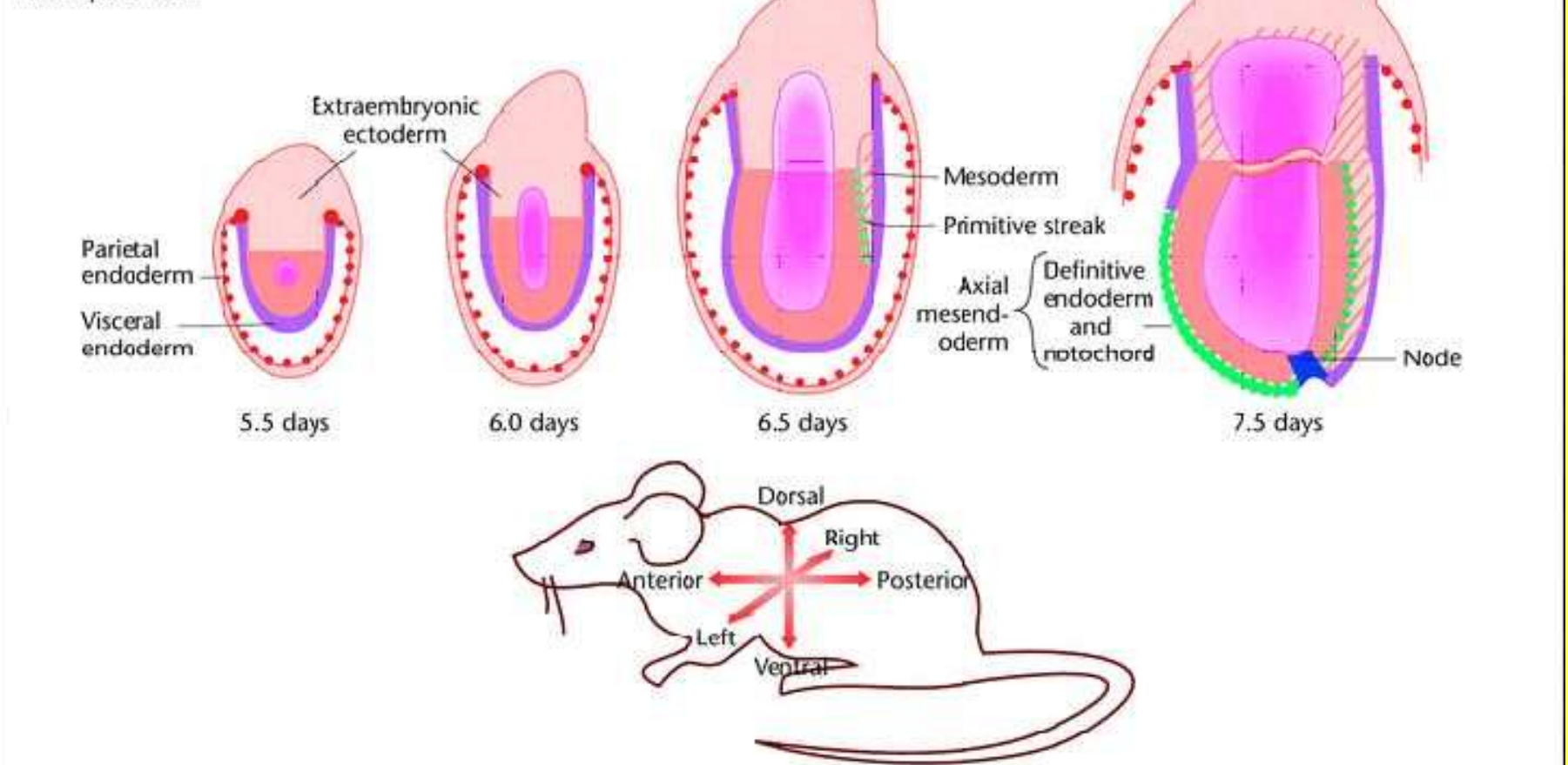
Предполагается что детерминанты сегрегируют неравномерно в дочерние клетки при поляризации бластомеров. Одной из таких детерминант является транскрипционный фактор *Cdx2* (*caudal type homeobox2*). Показано, что мРНК *Cdx2* локализуется в апикальном домене бластомеров уже на 8-ми клеточной стадии. Предполагается, что апикальная локализация создает реальные предпосылки предпочтительного наследования мРНК *Cdx2* дочерними клетками расположенными во внешнем слое эмбриона. Несомненно, что эти события предопределяют дальнейшую судьбу клеток.

Другая группа транскрипционных факторов: octamer 3/4 (Oct4), Nanog и SRYbox containing gene 2 (Sox2) определяют становление ВКМ. У мышей экспрессия Oct4, Nanog и Sox2 первоначально равномерно распределены среди бластомеров, но распределение их ограничено внутренними клетками, а в дальнейшем ВКМ, на стадии бластоцисты.

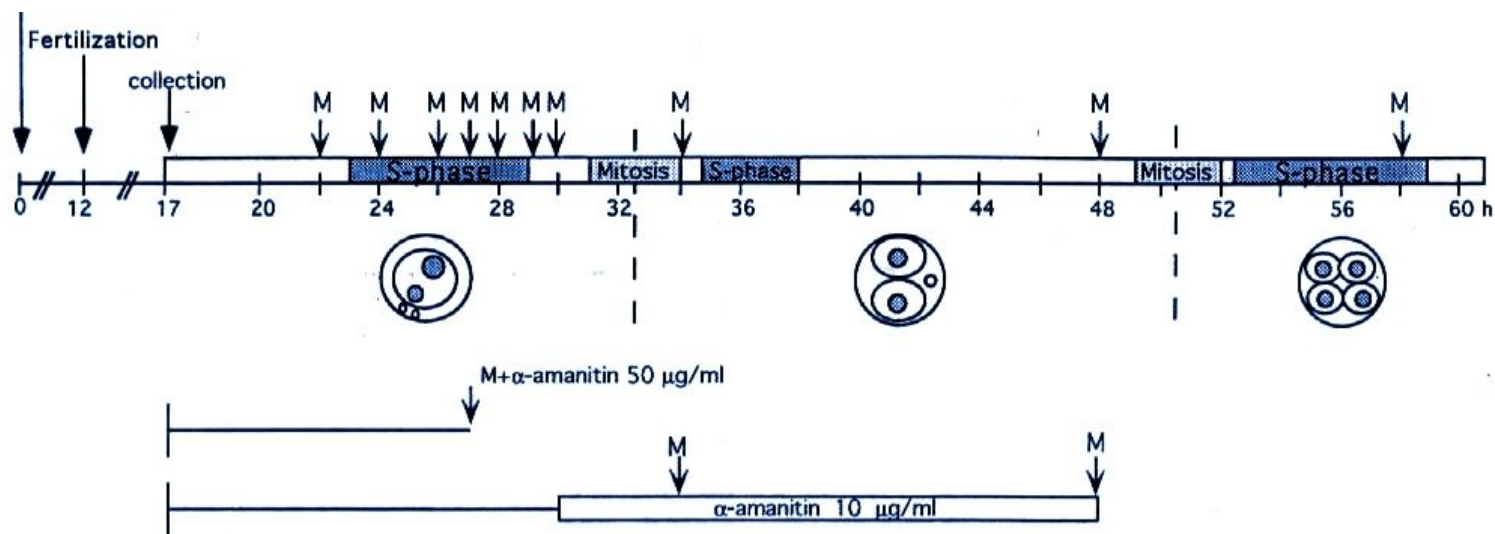
Preimplantation



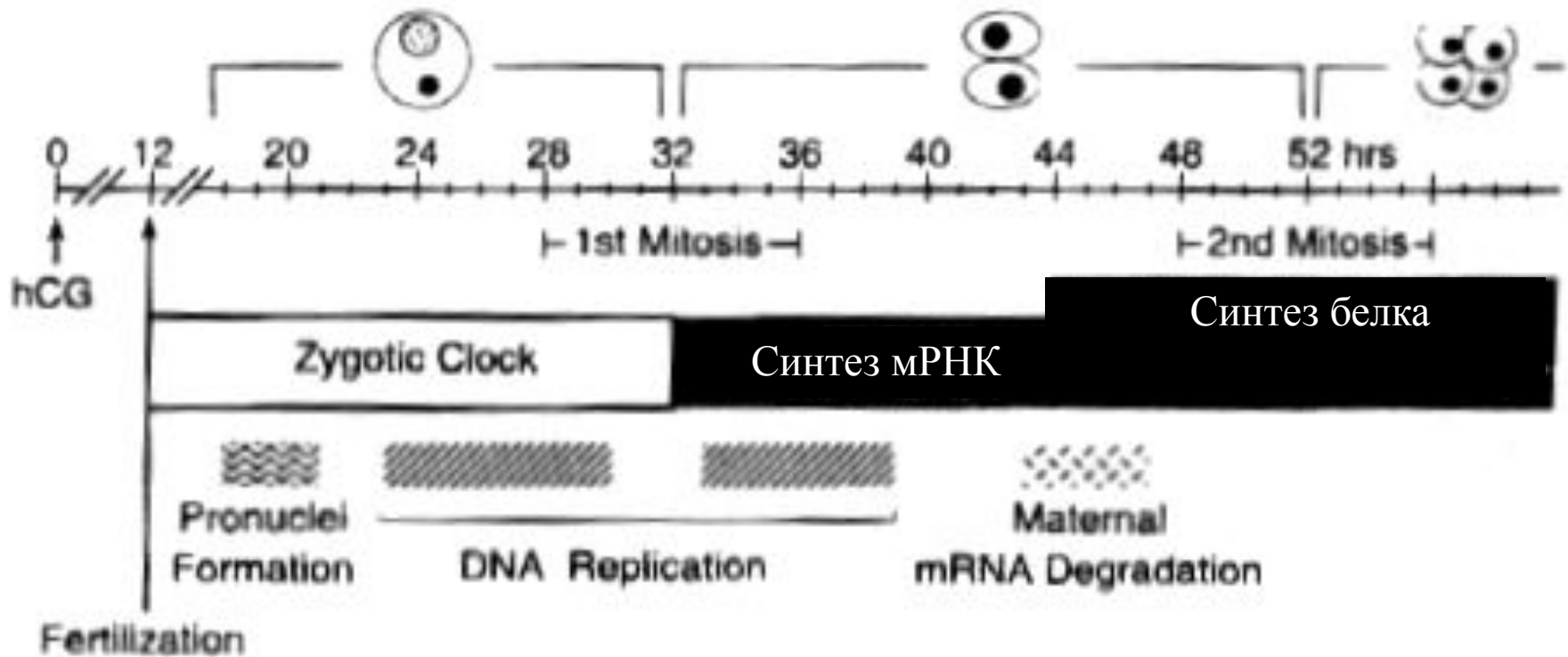
Postimplantation



Временные клеточного цикла в первые часы после оплодотворения. М – микроинъекции конструкции с геном репортером, альфа-аматин ингибитор РНК-полимеразы II (блок транскрипции)



Анализ активности промотора конструкции с геном репортером (люцифераза). hCG – время введения хориогонина



Экспрессия транспозоновых элементов в зрелых ооцитах, 2-х клеточных эмбрионах и бластоцистах по данным анализа сДНК библиотек (Peaston et al. 2004)

Table 1. Expression of Transposable Elements in Full-Grown Oocyte, 2-Cell Stage Embryo, and Blastocyst cDNA Libraries

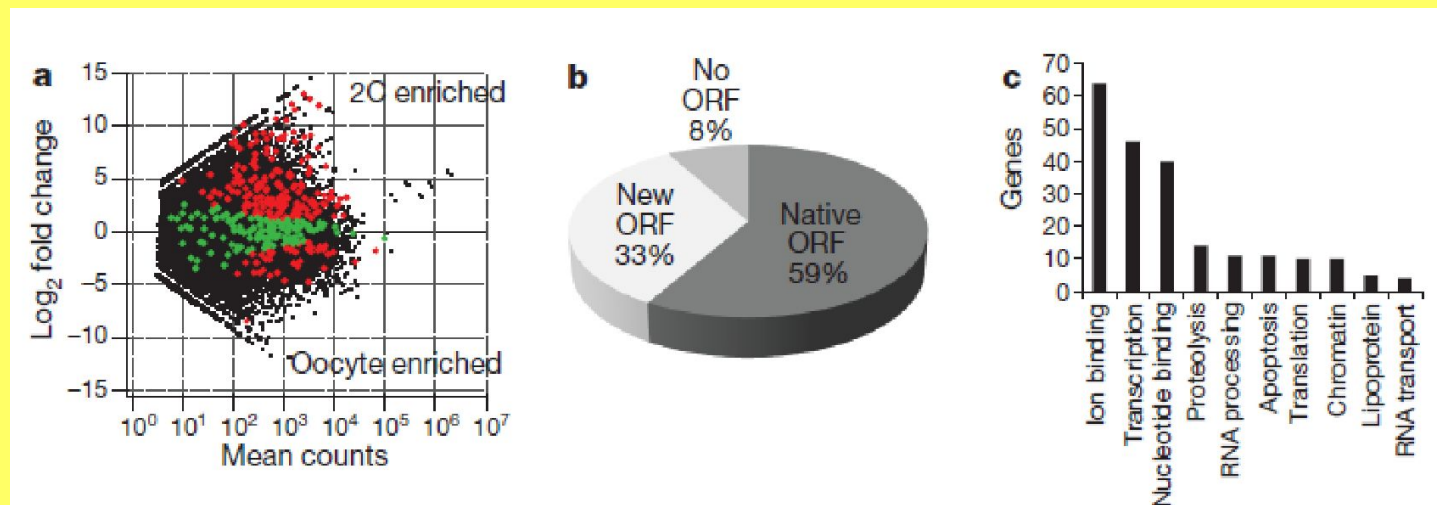
Repetitive Element	Number of ESTs in the Library (% of All ESTs)					
	Full-Grown Oocyte		2-Cell		Blastocyst	
MT	2403	(12.73)	280	(2)	1	(0.01)
ORR	0		Peaston	(0.77)	6	(0.04)
MuERV-L	0		443	(3.16)	0	
IAP (ERV-K)	6	(0.14)	79	(0.56)	35	(0.23)
LINE	8	(0.04)	53	(0.38)	22	(0.15)
Other ^a	13	(0.07)	96	(0.68)	15	(0.1)

^a SINE elements were excluded from this analysis because size selection of transcripts for library construction prevented their representative inclusion. They are estimated to comprise 3%–5% of polyadenylated mRNA in oocytes and a lower proportion in blastocysts (Bachvarova, 1988).

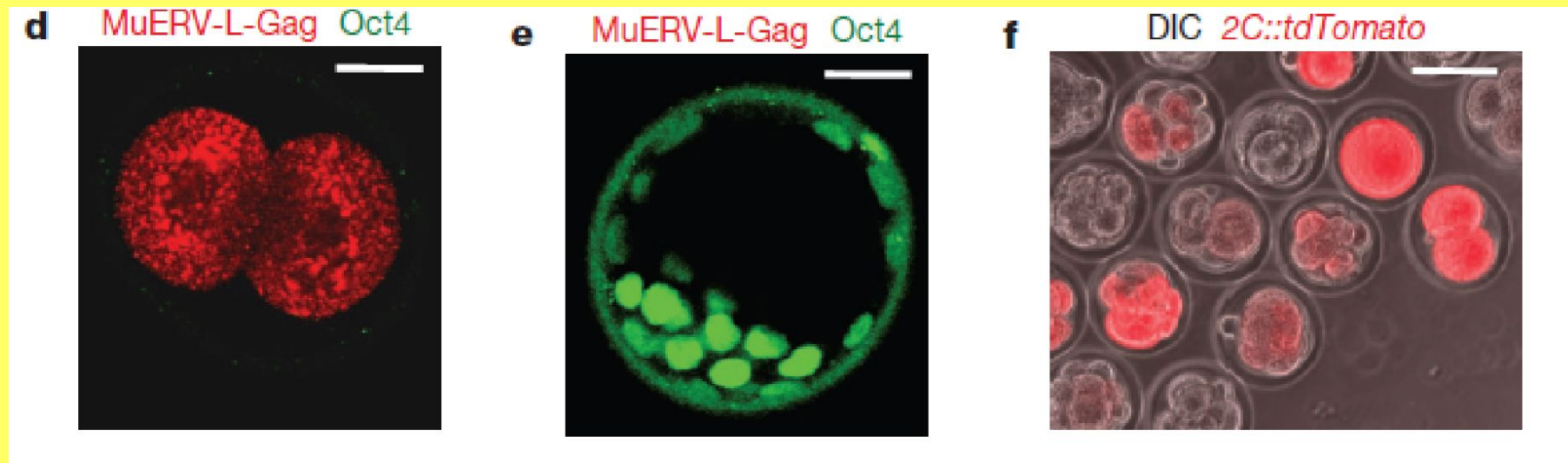
Экспрессия ретротранспозонов на стадии зиготы и 2-клеточной стадии

В зиготах экспрессируются эндогенные ретровирусы, LINE-1 и SINE элементы. Среди них, на 2-х клеточной стадии 3% транскрибируемых мРНК приходится на эндогенный ретровирус MuERV-L (Erv4; leucine tRNA primer).

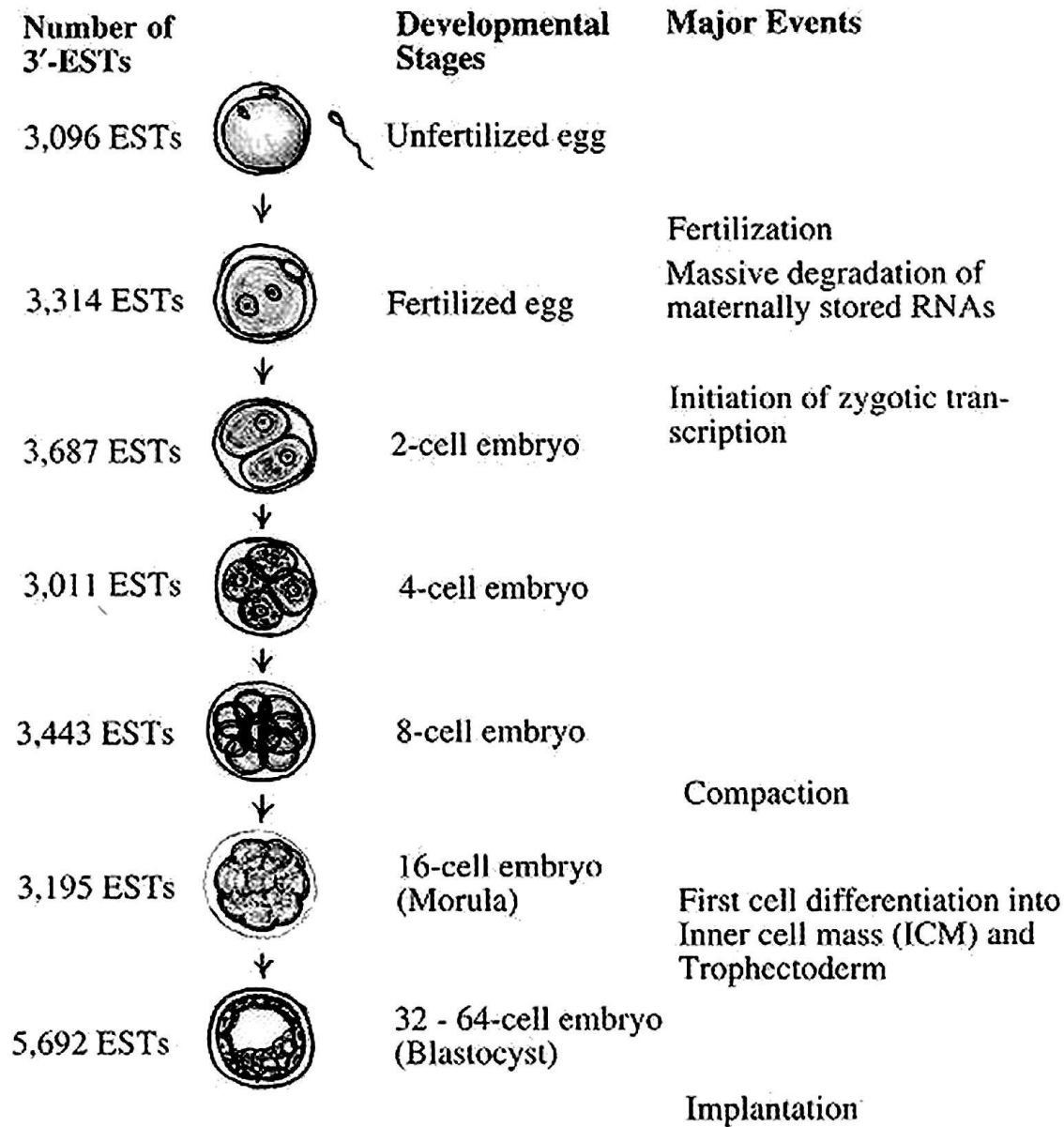
Однако, после 2-х клеточной стадии экспрессия этого ретровируса прекращается. Было показано, что экспрессия MuERV-L перекрывается со более чем 100 генов, на 2-х клеточной стадии. Более того, эти гены кооптируют регуляторные последовательности MuERV-L для своей транскрипции.



MuERV-L ретровирус и репортер управляемый LTR. **a**- сравнение экспрессии генов в ооцитах и в 2-х клеточных эмбрионах. Гены кооптированные с MuERV-L показаны зеленым и красным, причем последние отражают заметные изменения в экспрессии. **b** – ORF химерных и нехимерных транскриптов. **c** – gene ontology (GO) анализ MuERV-L-связанных с белок-кодирующими транскриптами. Количество генов обогащенных более 10 GO (Macfarlan et al., 2011).



2-х клеточный эмбрион (d) и бластоциста (e) окрашенные антителами против MuERV-L-Gag. Зиготы и 2-х клеточные эмбрионы после инъекции ДНК трансгена экспрессирующего репортерный ген *Tomato* (красный).



Stages of preimplantation development and number of collected 3'-ESTs.

Group A: Low expression

						No.	No.	No.		
U	F	2	4	8	M	B	Known	Unknown	Total	% Total
□	□	□	□	□	□	□	499	6766	7265	74.76%

Group B: Constitutive expression

						No.	No.	No.		
U	F	2	4	8	M	B	Known	Unknown	Total	% Total
■	■	■	■	■	■	■	1	10	11	0.11%

Group C: Complex expression

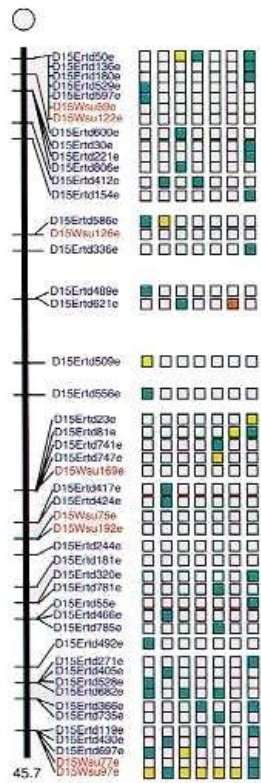
						No.	No.	No.		
U	F	2	4	8	M	B	Known	Unknown	Total	% Total
□	□	□	□	□	□	□	143	173	316	3.25%

Group D: Single-peak expression

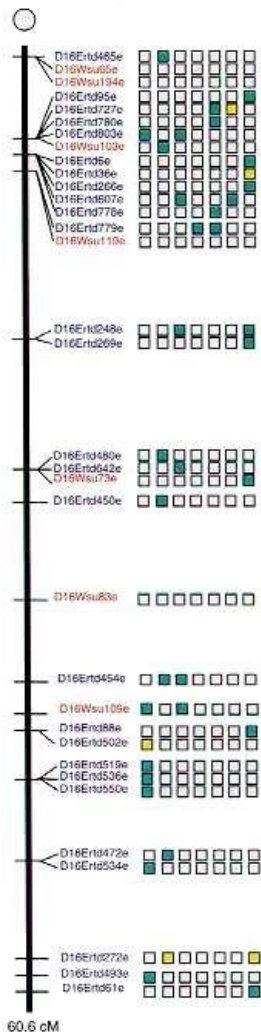
						No.	No.	No.			
	U	F	2	4	8	M	B	Known	Unknown	Total	% Total
1	■	□	□	□	□	□	□	23	268	291	2.99%
2	■	■	□	□	□	□	□	7	24	31	0.32%
3	■	■	■	□	□	□	□	2	9	11	0.11%
4	■	■	■	■	□	□	□	0	2	2	0.02%
5	■	■	□	□	□	□	□	45	198	243	2.50%
6	■	■	■	□	□	□	□	4	8	12	0.12%
7	■	■	■	■	□	□	□	3	1	4	0.04%
8	■	■	■	■	■	□	□	1	1	2	0.02%
9	■	■	■	■	■	■	■	3	4	7	0.07%
10	■	■	■	■	■	□	□	35	247	282	2.90%
11	■	■	■	■	■	□	□	3	8	11	0.11%
12	■	■	■	■	■	□	□	0	1	1	0.01%
13	■	■	■	■	■	■	□	0	1	1	0.01%
14	■	■	■	■	■	■	■	8	1	9	0.09%
15	■	■	■	■	■	■	□	42	206	248	2.55%
16	■	■	■	■	■	■	□	7	6	13	0.13%
17	■	■	■	■	■	■	□	0	3	3	0.03%
18	■	■	■	■	■	■	■	1	2	3	0.03%
19	■	■	■	■	■	■	■	6	0	6	0.06%
20	■	■	■	■	■	■	□	59	288	347	3.57%
21	■	■	■	■	■	■	■	7	18	25	0.26%
22	■	■	■	■	■	■	■	7	7	14	0.14%
23	■	■	■	■	■	■	■	49	338	387	3.98%
24	■	■	■	■	■	■	■	12	0	12	0.12%
25	■	■	■	■	■	■	■	110	51	161	1.66%

Fig. 2. Grouping of genes based on the global expression patterns. U, unfertilized; F, fertilized; 2, 4, 8, 2-cell, 4-cell and 8-cell embryos; M, morula; B, blastocyst.

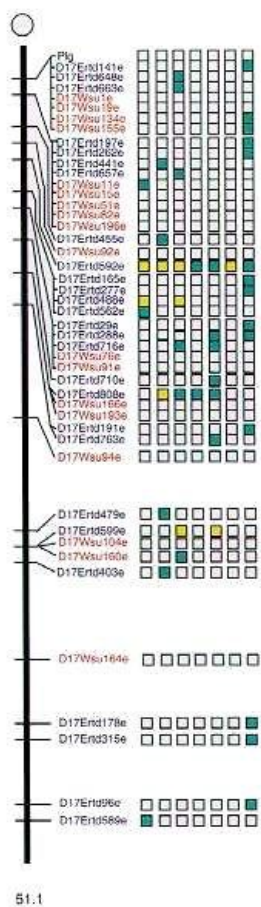
Chromosome 15



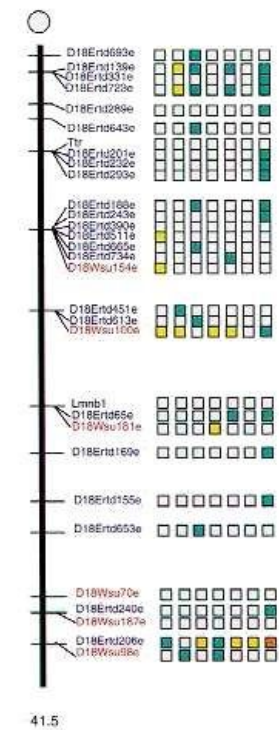
Chromosome 16



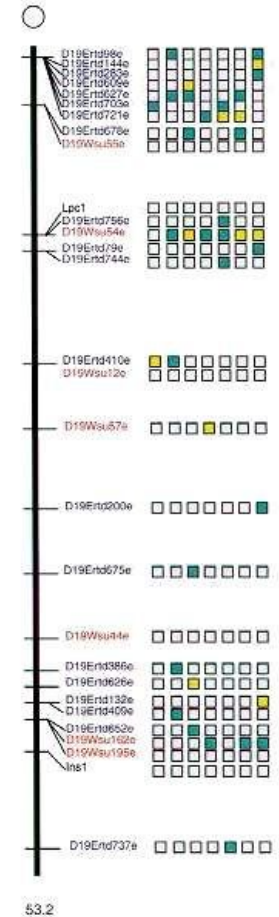
Chromosome 17



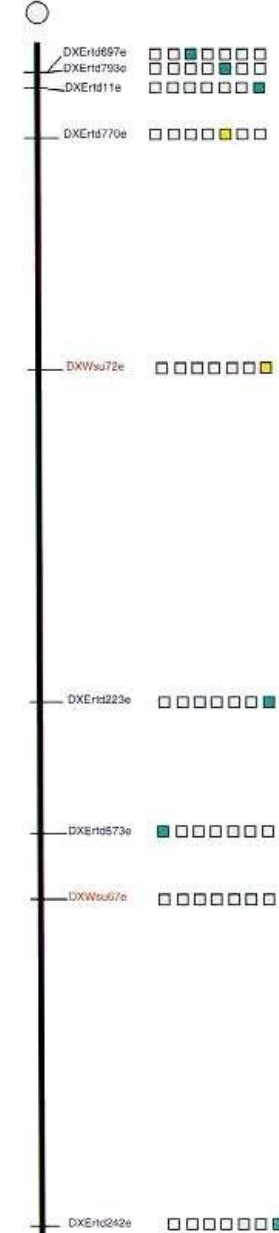
Chromosome 18



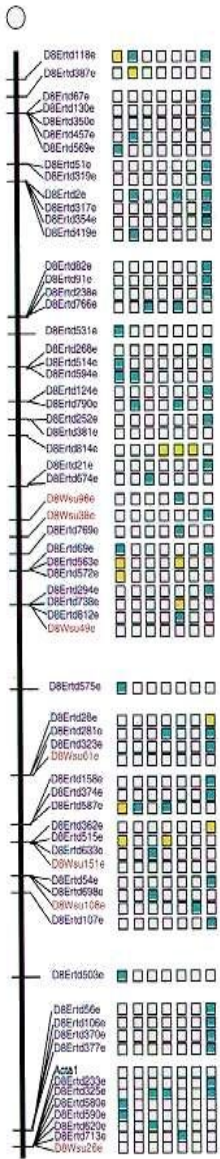
Chromosome 19



Chromosome X

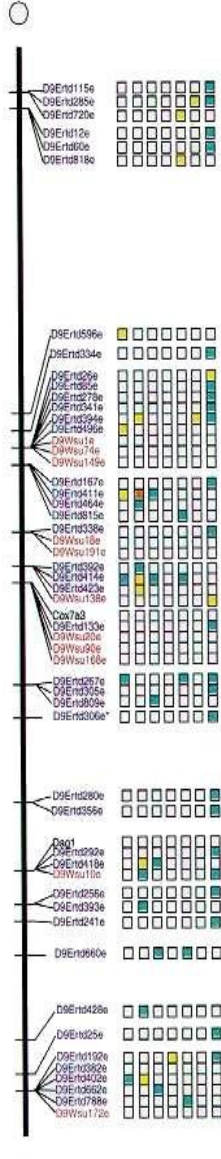


Chromosome 8



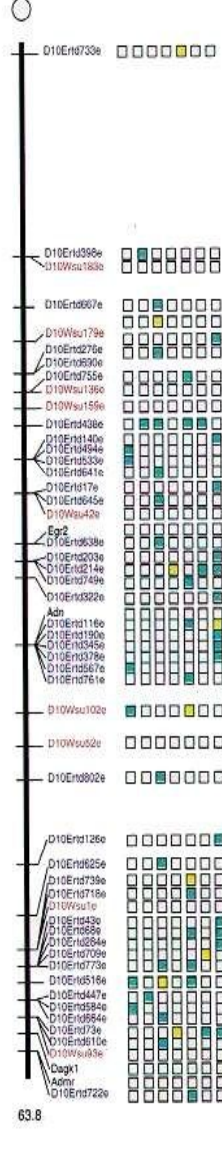
68.1

Chromosome 9



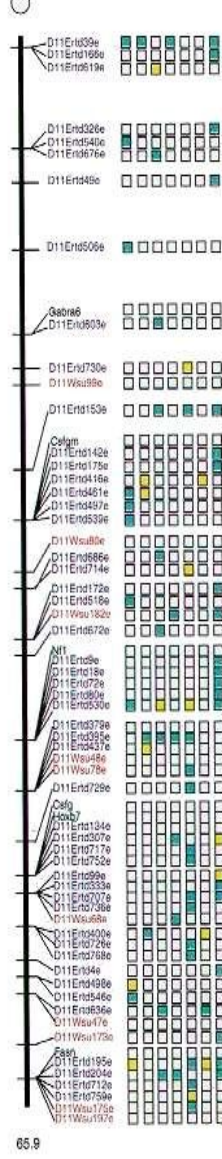
67.0

Chromosome 10



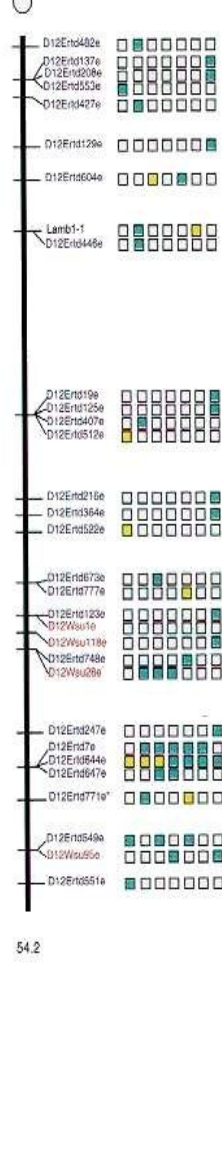
63.8

Chromosome 11



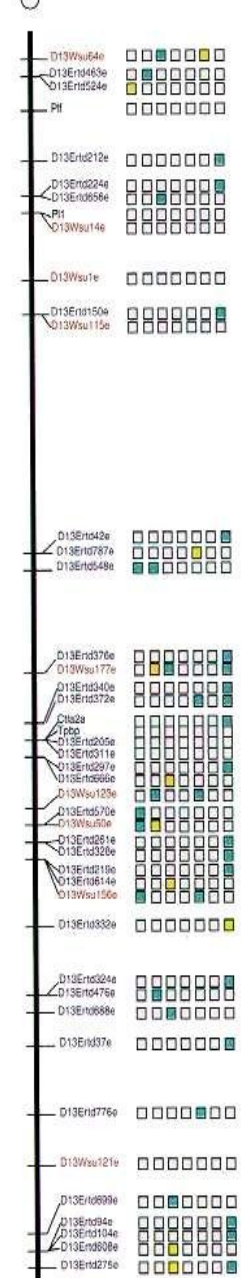
65.9

Chromosome 12



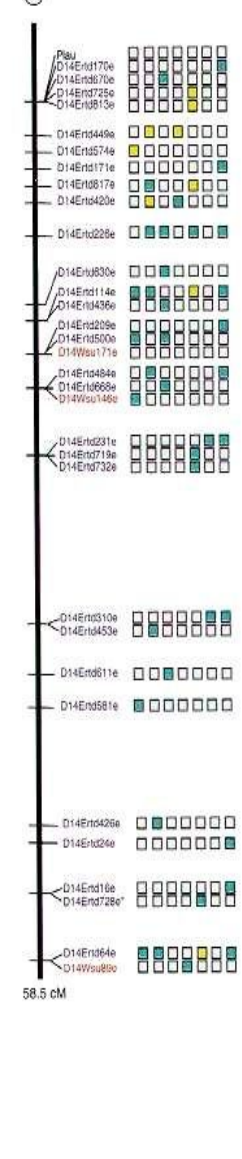
54.2

Chromosome 13



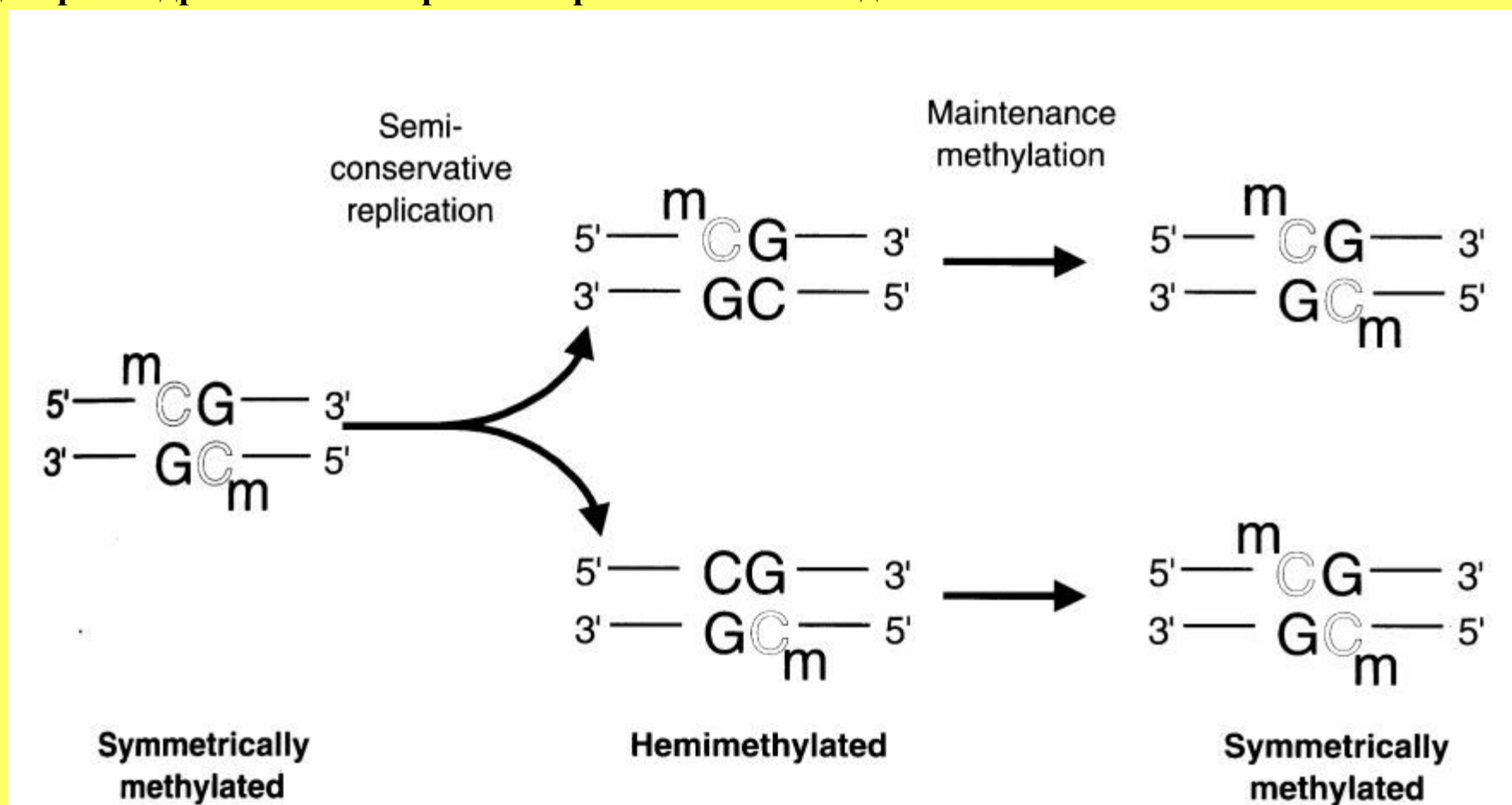
76.6

Chromosome 14



58.5 cM

Метилирование ДНК. Полуконсервативный способ репликации метилированных динуклеотидов CpG в геномной ДНК дает дочернюю нить, которая гемиметилирована тогда как неметилированный цитозин включается в обе синтезирующиеся нити. Поддержание метилтрансферазной активности переводит гемиметилированные сайты в симметрично метилированные формы, по существу копируя спектр метилирования другой нити. Таким образом, метилтрансфераза обеспечивает в дальнейших раундах репликации, чтобы каждое дочернее ядро несло спектр метилирования только одной нити.



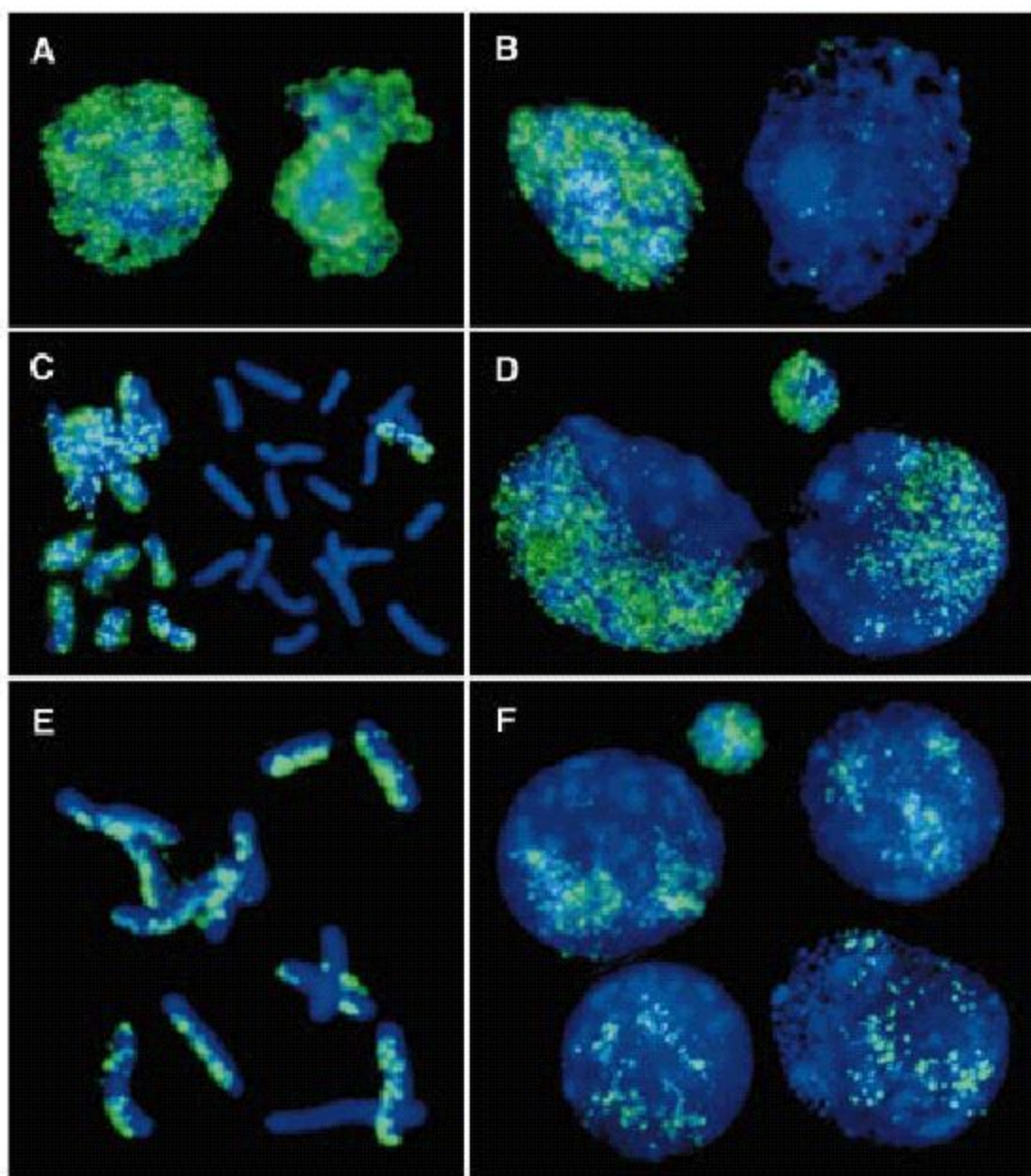
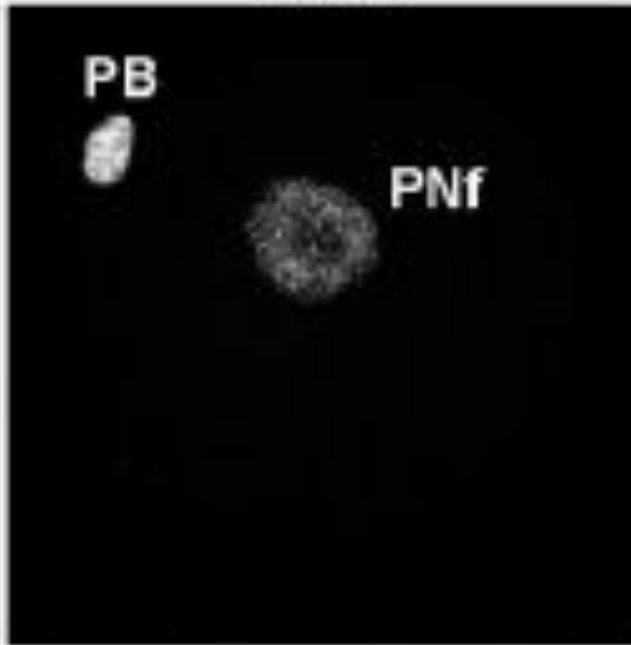
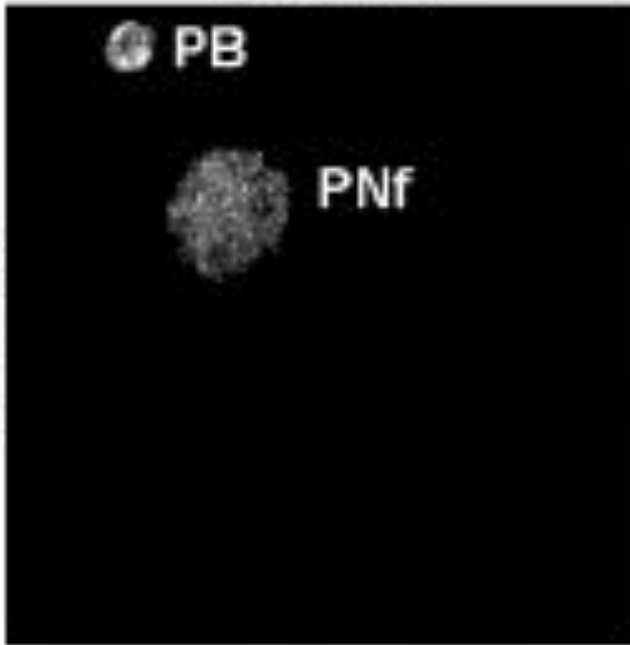


Figure 2. Differential demethylation of parental genomes in early mouse embryos. Nuclei were stained with FITC-conjugated anti-MeC antibody (green) and counterstained with DAPI (blue). **(A)** Zygote 3 h after fertilization with equally methylated paternal and maternal chromosomes. **(B)** Undermethylation of the larger male pronucleus at 8 h after fertilization, compared with the fully methylated female pronucleus. **(C)** First metaphase. **(D)** Two-cell embryo with differentially methylated parental genomes. Note the fully methylated second polar body. **(E)** Partial second metaphase spread showing differential sister chromatid staining on the maternal chromosomes. **(F)** Four-cell embryo with much weaker MeC staining of the maternal half of the nucleus.

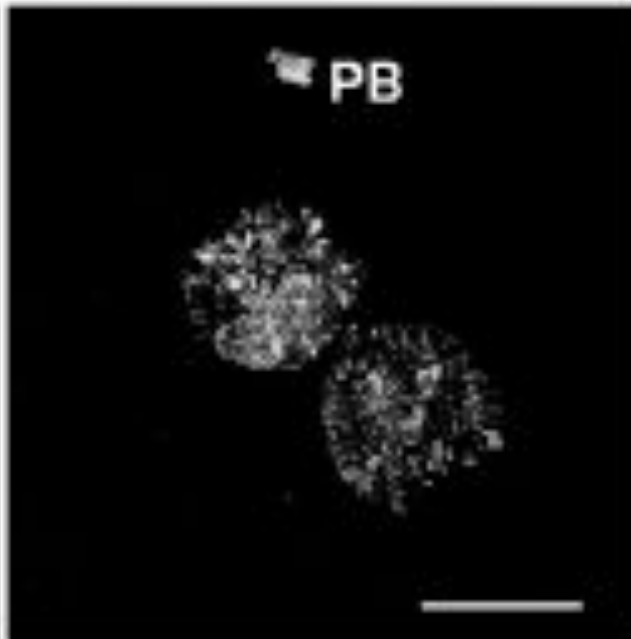
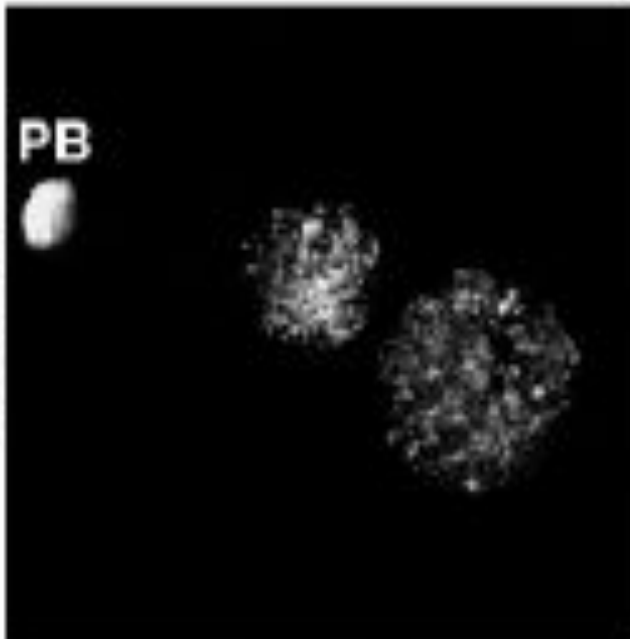
in vivo

ICSI

mouse



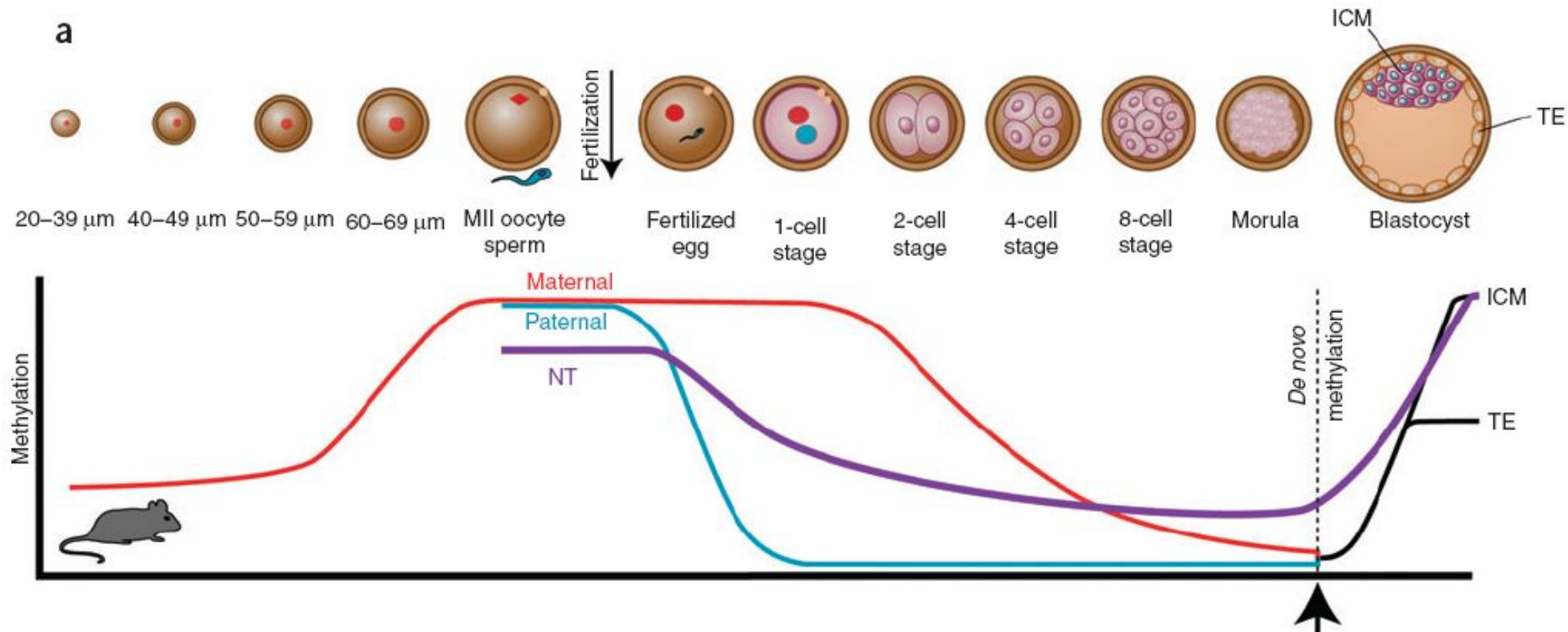
sheep



Иммунодетекция 5mC в мышинных и овечьих нормальных эмбрионах или полученных оплодотворением in vitro.

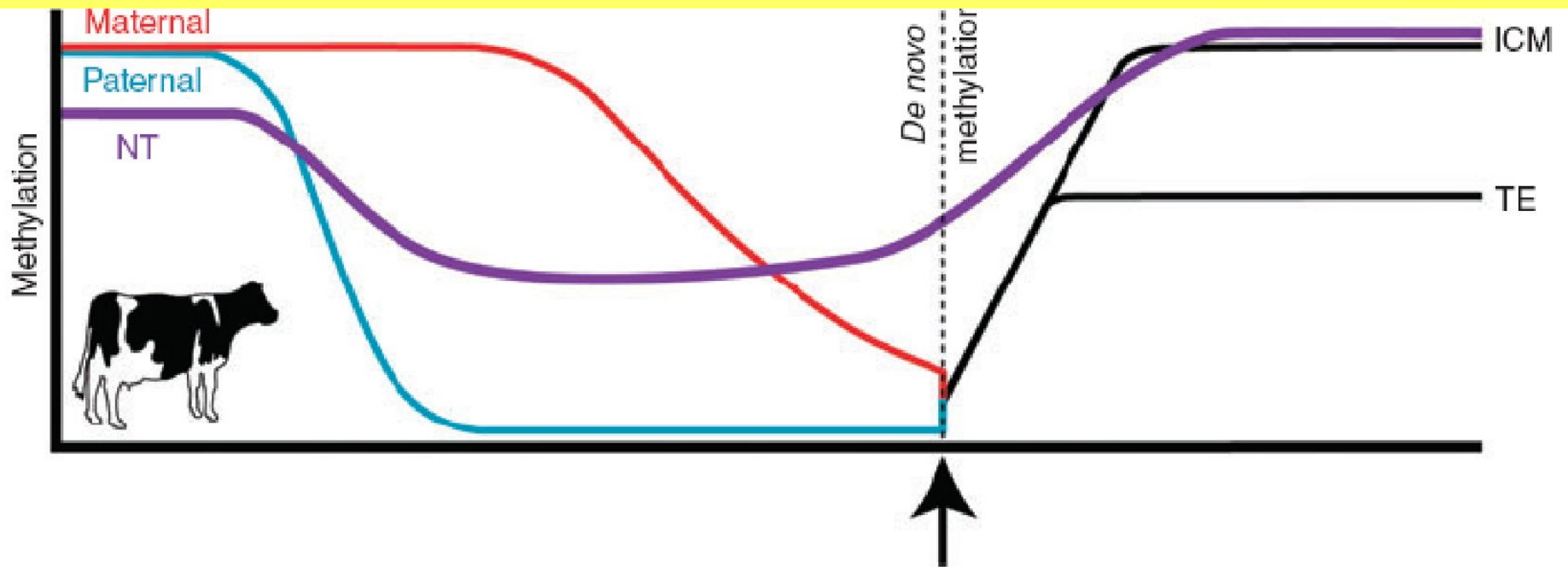
Видно, что у овцы оба пронуклеуса позитивны по 5mC, тогда как у мыши только материнский. PB – полярное тельце (Beaujean et al., 2004)

Схема развития ооцита и раннее развитие мыши.
Метилирование ДНК материнского (красный цвет) и отцовского (синий) геномов. Сиреневый цвет показывает метилирование ДНК «клонированных» эмбрионов мыши. Черным выделено метилирование ВКМ и ТЭ у «клонированных» мышей (Yang et al. 2007)



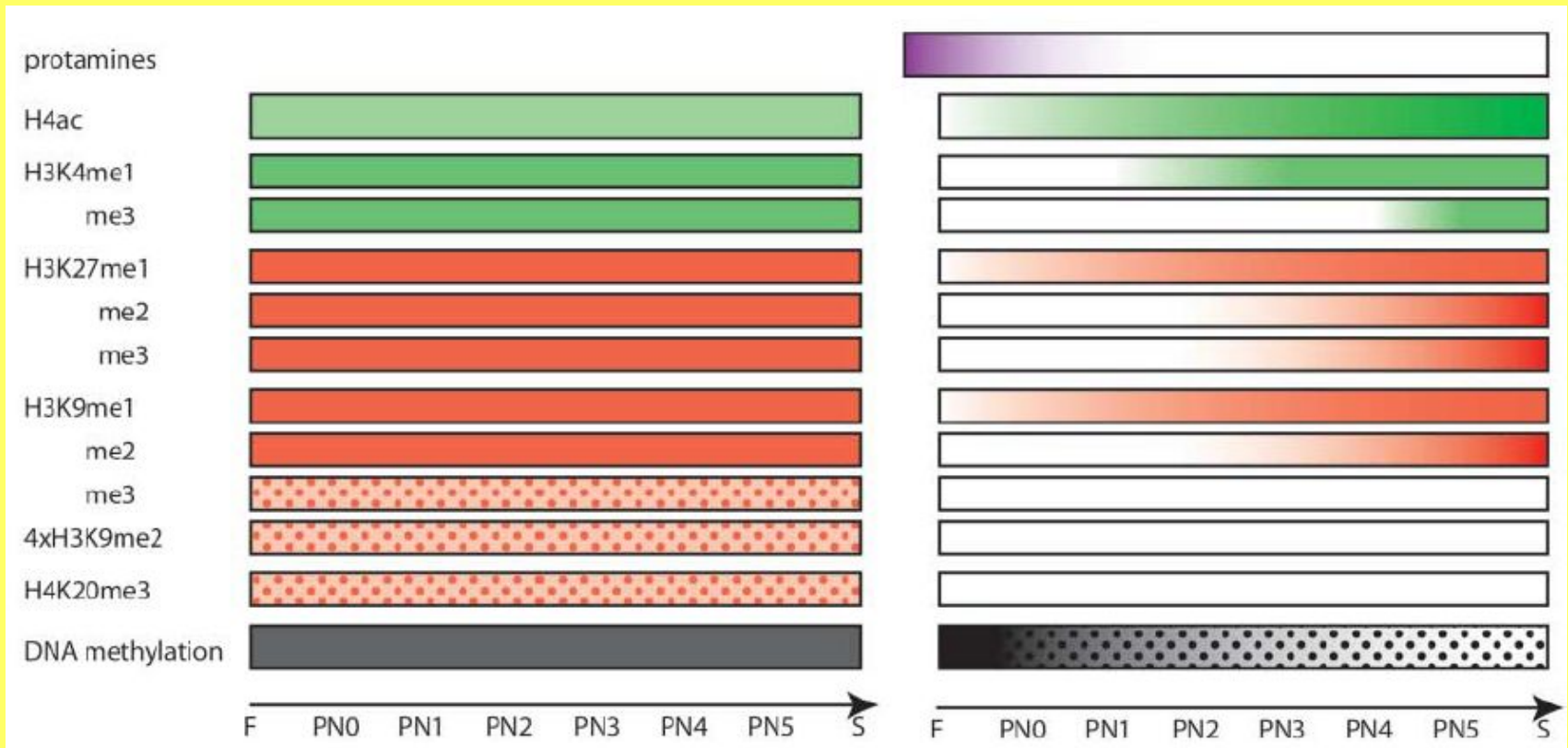
Метилирование ДНК материнского (**красный цвет**) и отцовского (**синий**) геномов в раннем развитии коров в сравнении с «клонированными эмбрионами (**сиреневый**)».

Черным цветом показано метилирование ДНК ВКМ и ТЭ у «клонированных» эмбрионов (Yang et al., 2007)



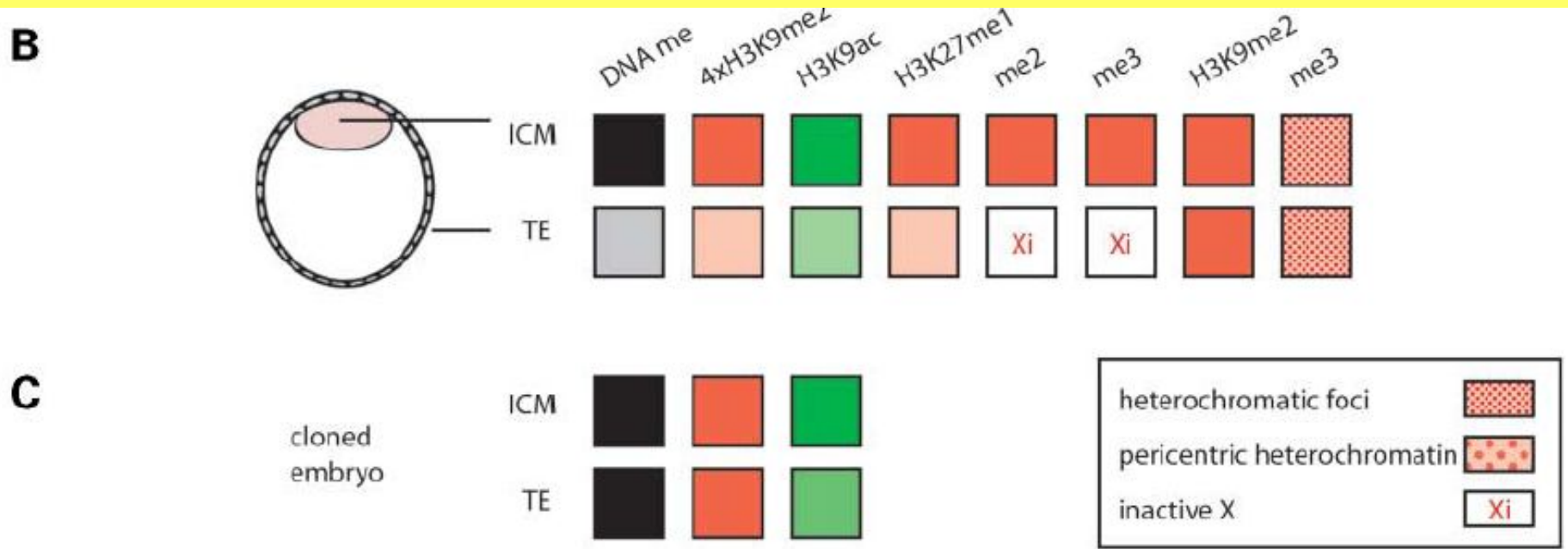
Материнский пронуклеус

Отцовский пронуклеус

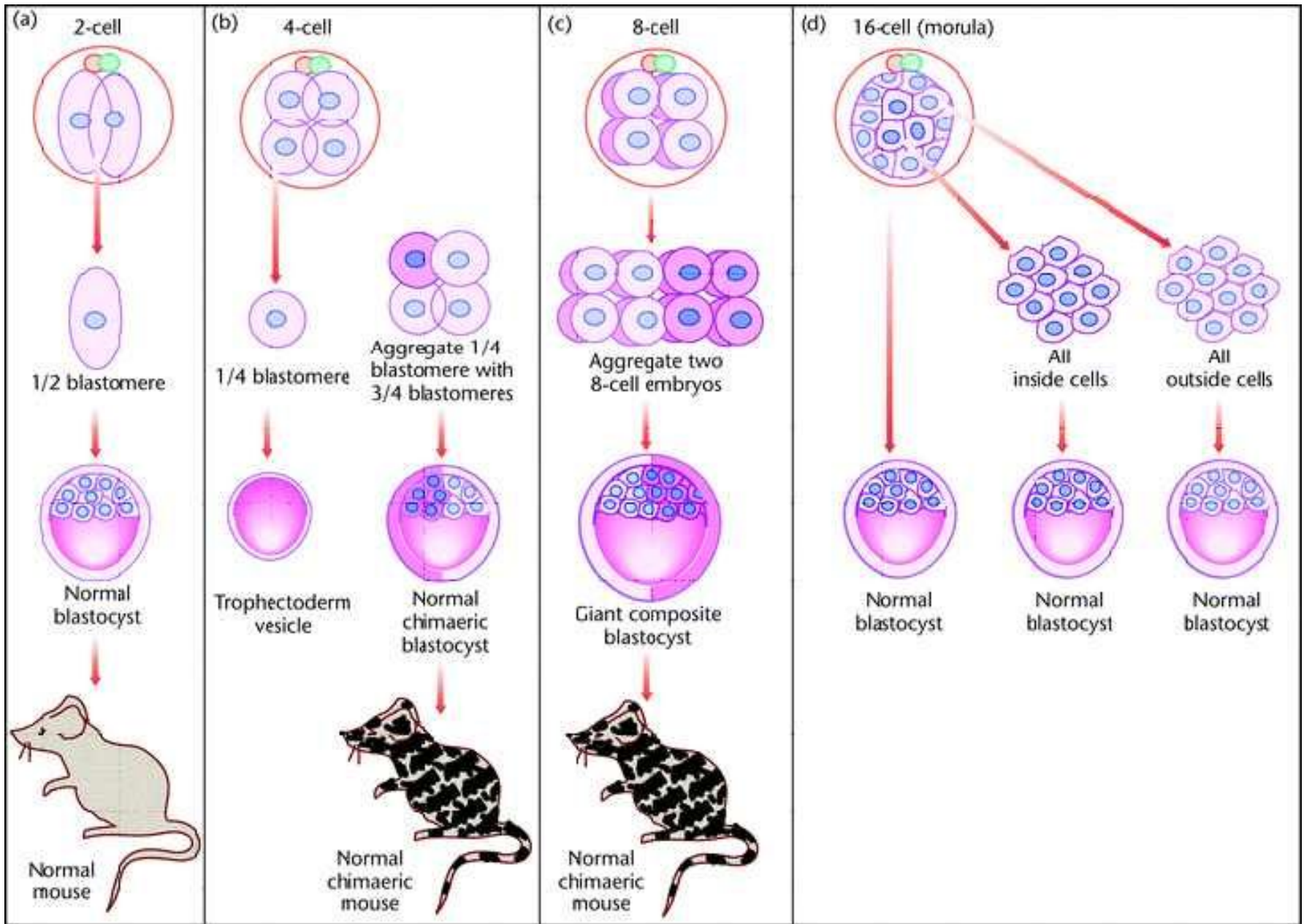


Эпигенетическое репрограммирование. Ремоделирование мужского и женского пронуклеусов. Транскрипционные (зеленый цвет) и репрессивные (красный) модификации с разной степени выраженные от момента оплодотворения (F) через стадии PN1 до PN 5 до слияния пронуклеусов. В отцовском пронуклеусе происходит замена протаминов (сиреневый цвет) на гистоны, которые гиперметируются по H3K27me1 и H3K9me1, но не H3K4me1, me3, H3K27me2 и me3, H3K9, me2 me3, а гетерохроматиновые гистоны 4xH3K9me2 и H4K20me3 метилированы. Метилирование ДНК (черный цвет) снижается перед репликацией ДНК PN3- PN14, за исключением прицентромерного гетерохроматина, некоторых повторов (IAPs) и отцовских метилированных импринтов. H3K9me2, me3, H4K20me2 маркируют материнский пронуклеус.

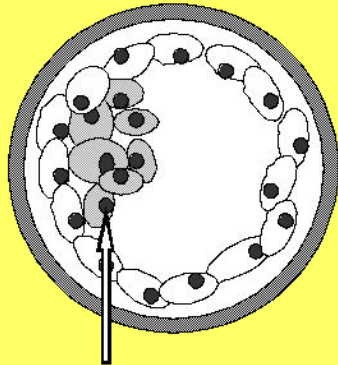
Эпигенетические различия между ВКМ и ТЭ в раннем развитии нормальных (В) и клонированных (С) мышей



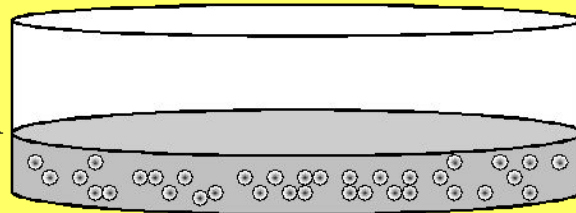
Метилирование ДНК *de novo* в ВКМ, но значительно менее это выражено в ТЭ мышей, коров, овец. H3K9ac и метилирование гистона гетерохроматина меняется в бластоцисте преимущественно в ВКМ. H3K27me1, me2 и me3 выявляются преимущественно в ВКМ, а H3K27me2 и me3 маркируют неактивную X-хромосому в ТЭ у мыши. H3K9me2 одинаково распределены как в ВКМ, так и ТЭ. У клонированных эмбрионов коров и овец, метилирование ДНК, и гистонов гетерохроматина и H3K9ac у коров избыточное в ТЭ.



Бластоциста

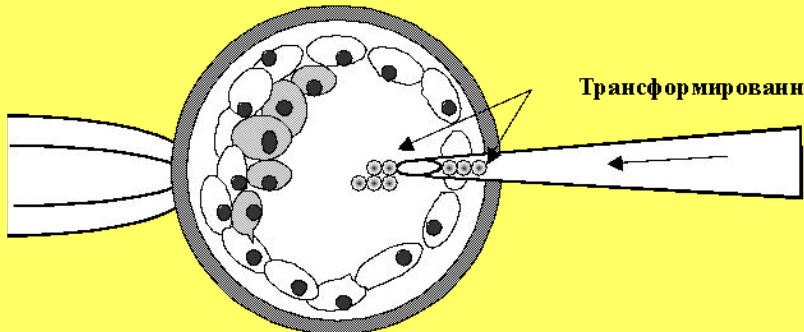


Внутренняя клеточная масса

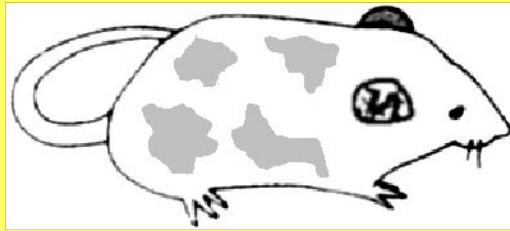


Культура ЭС клеток

- трансфекция экзогенной ДНК
- адресная инсерция экзогенной ДНК



Трансформированные ЭС клетки



Химера

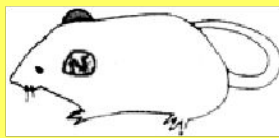


+/+

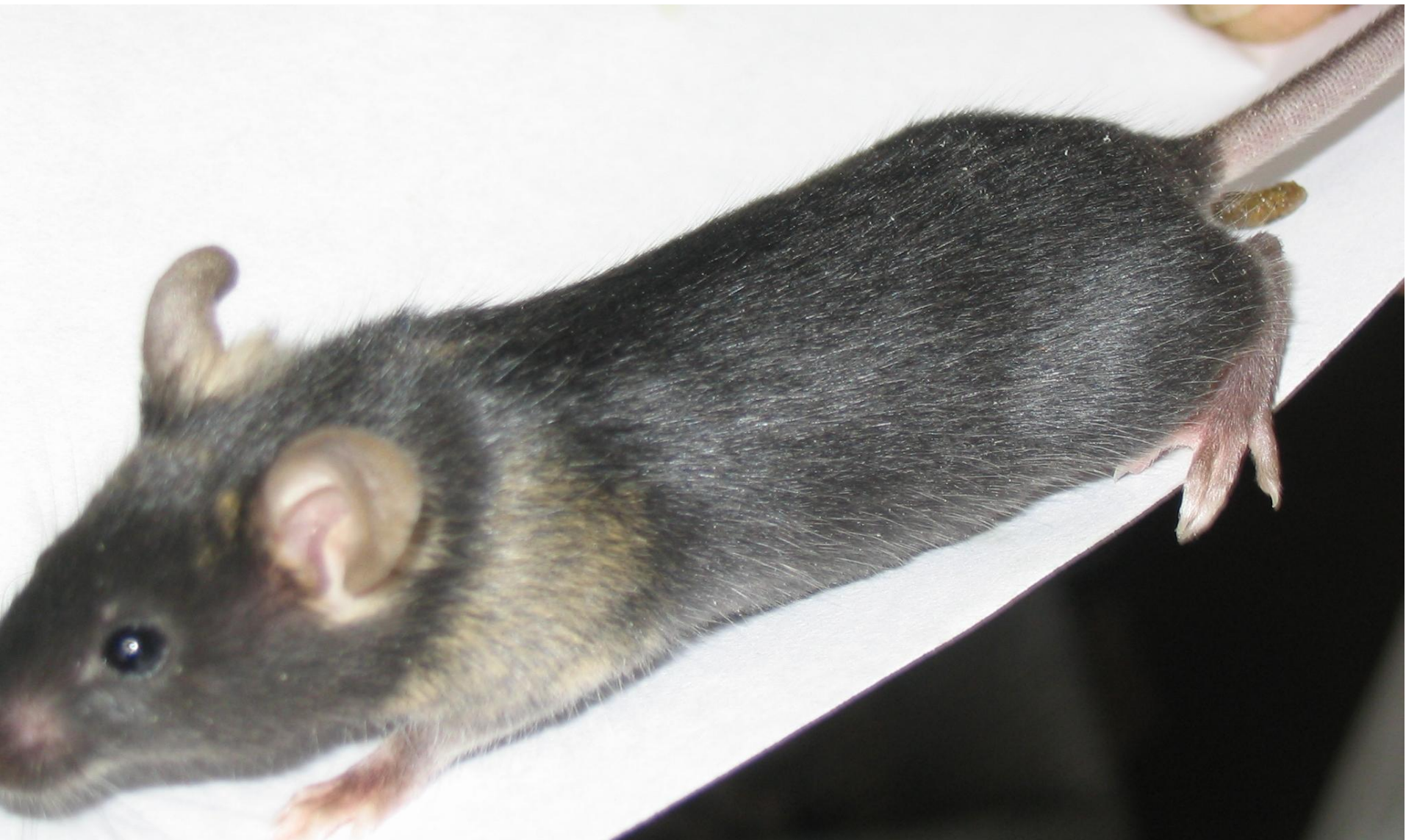
F1



Генотип идентичный ЭС клеткам



+/+





Эффективность развития эмбрионов после оплодотворения *in vitro* (a), инъекции ЭС клеток в тетраплоидные бластоцисты (b,c) и переноса ядер (Yang et al., 2007)

