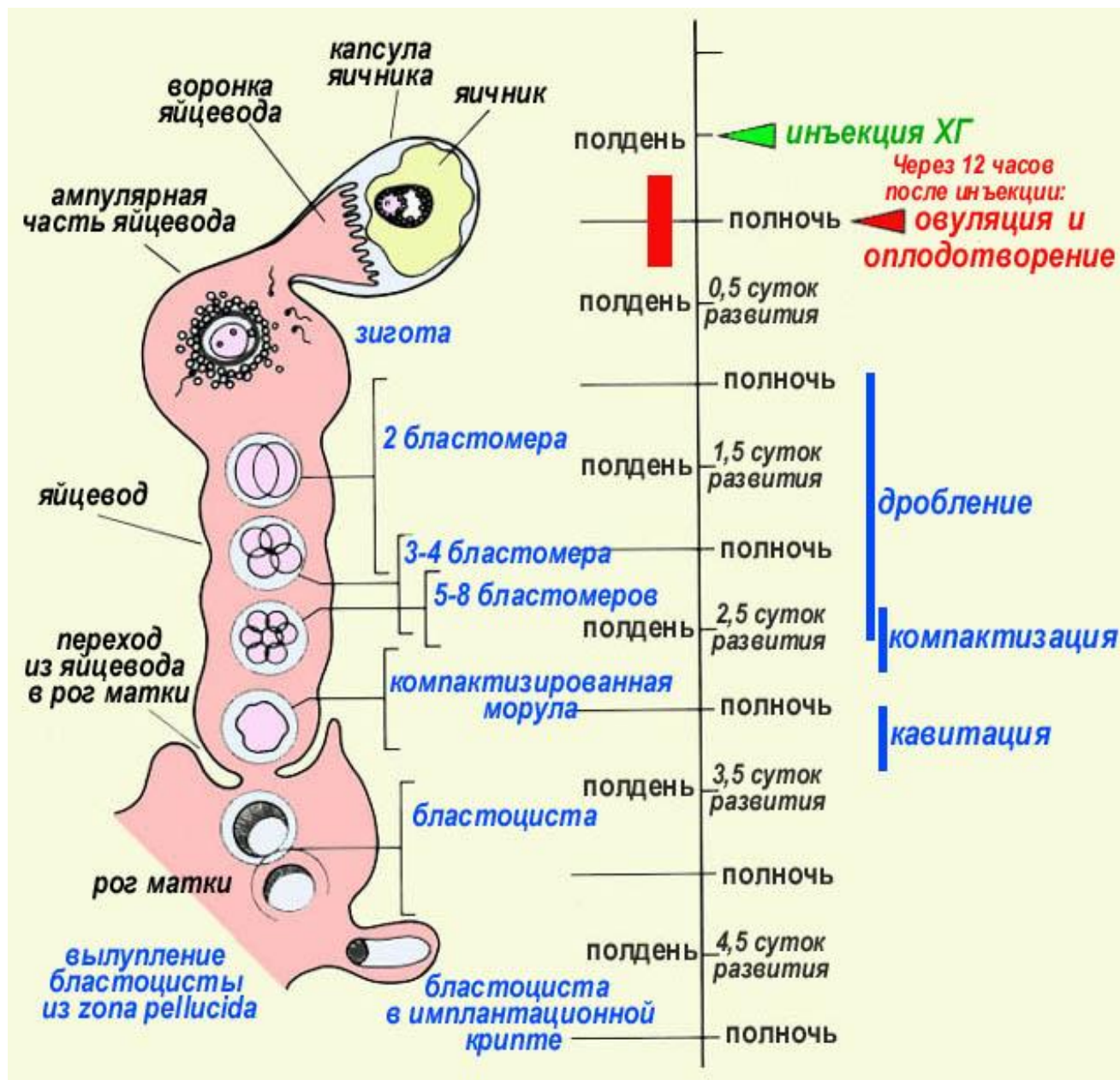
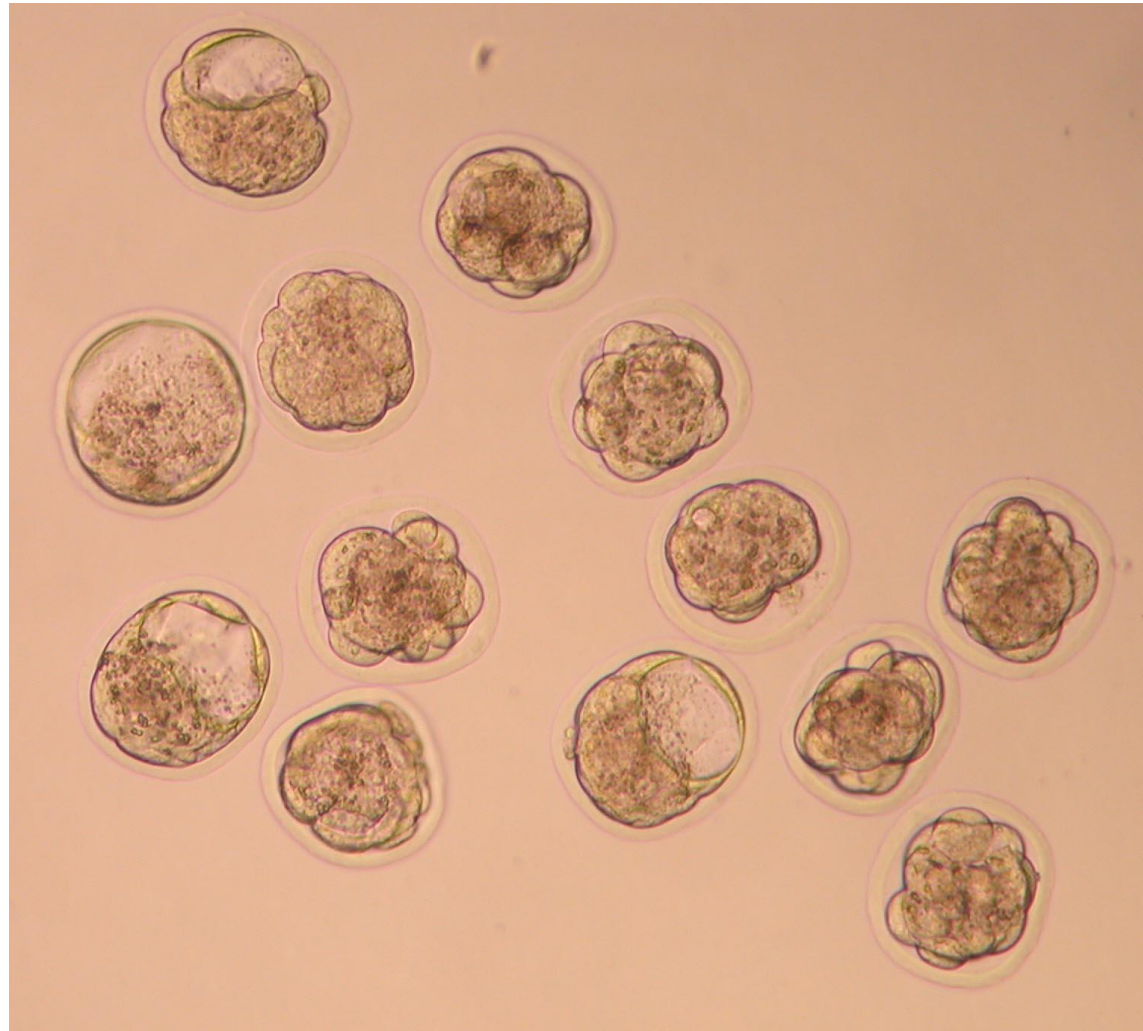
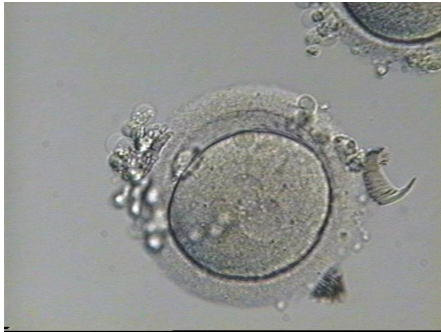


Развитие до имплантации

Мышь от оплодотворения до имплантации: 1 – 5 сутки развития

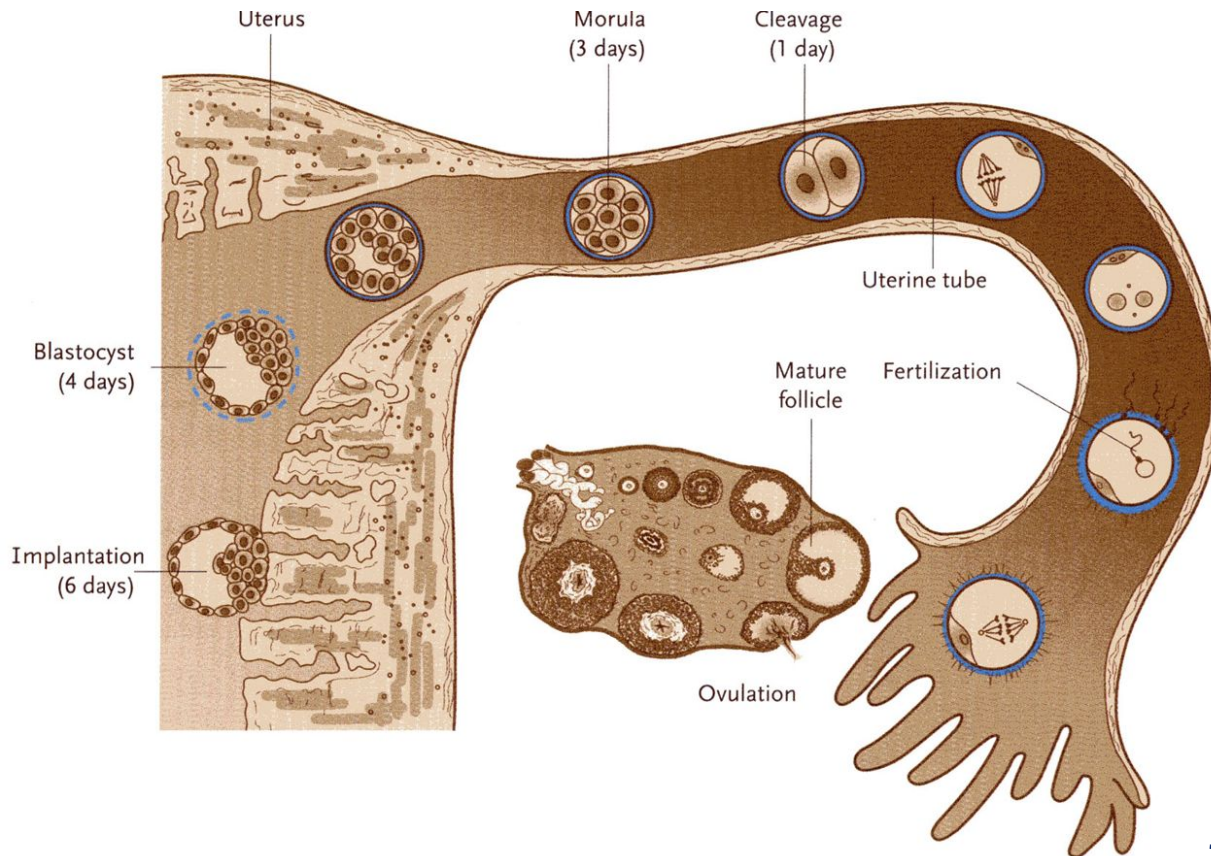


Эмбрионы мыши и человека



MZT maternal-to-zygotic transition

Важнейшее событие преимплантационного развития - переход управления развитием эмбриона от материнского генома (генома ооцита) к геному зародыша.

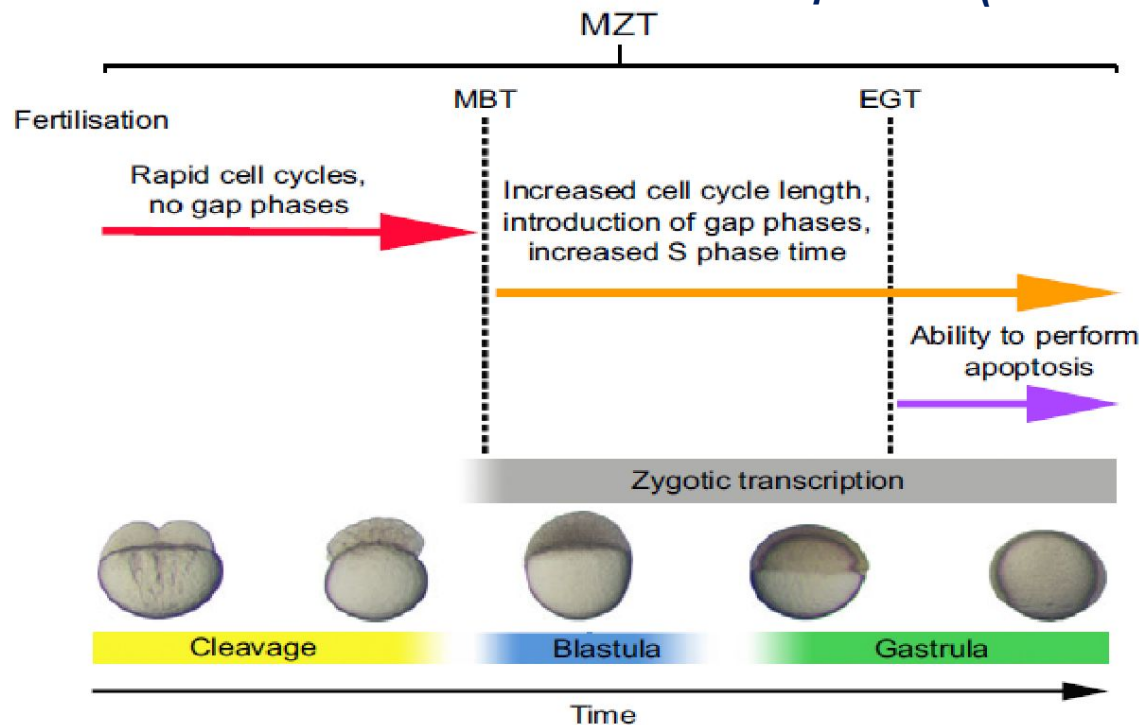


В раннем эмбрионе человека (как и любого другого животного) взаимодействуют две программы:

- материнская программа (реализуется за счет РНК, накопленных в оогенезе)
- программа эмбриона – за счет постепенного включения собственных генов

Успешное взаимодействие двух программ – это успешное развитие раннего эмбриона

**У большинства видов животных процесс MZT медленный:
в течение многих клеточных циклов (до 2-3 десятков циклов)**

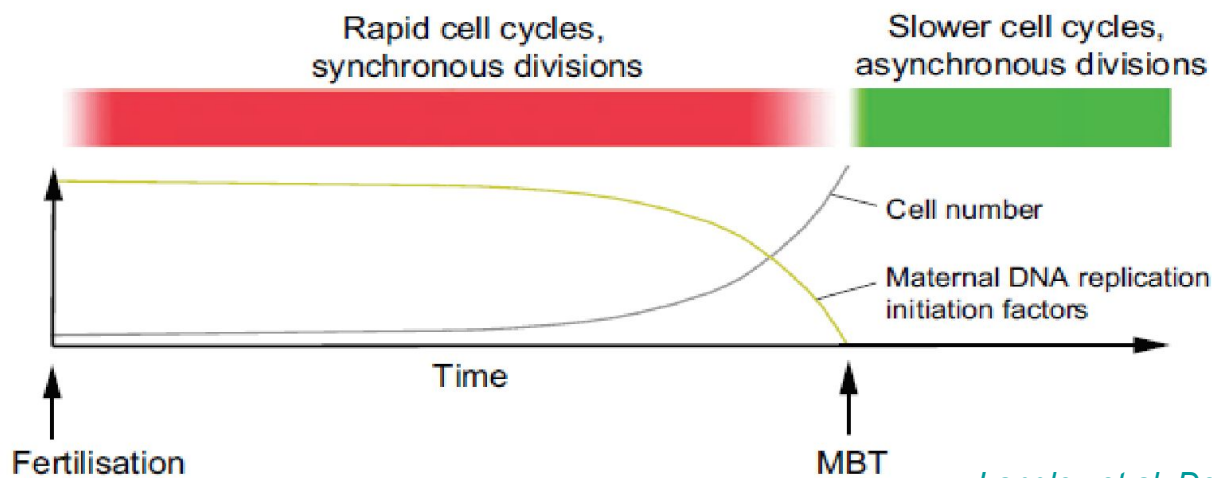


MBT – midblastula transition:

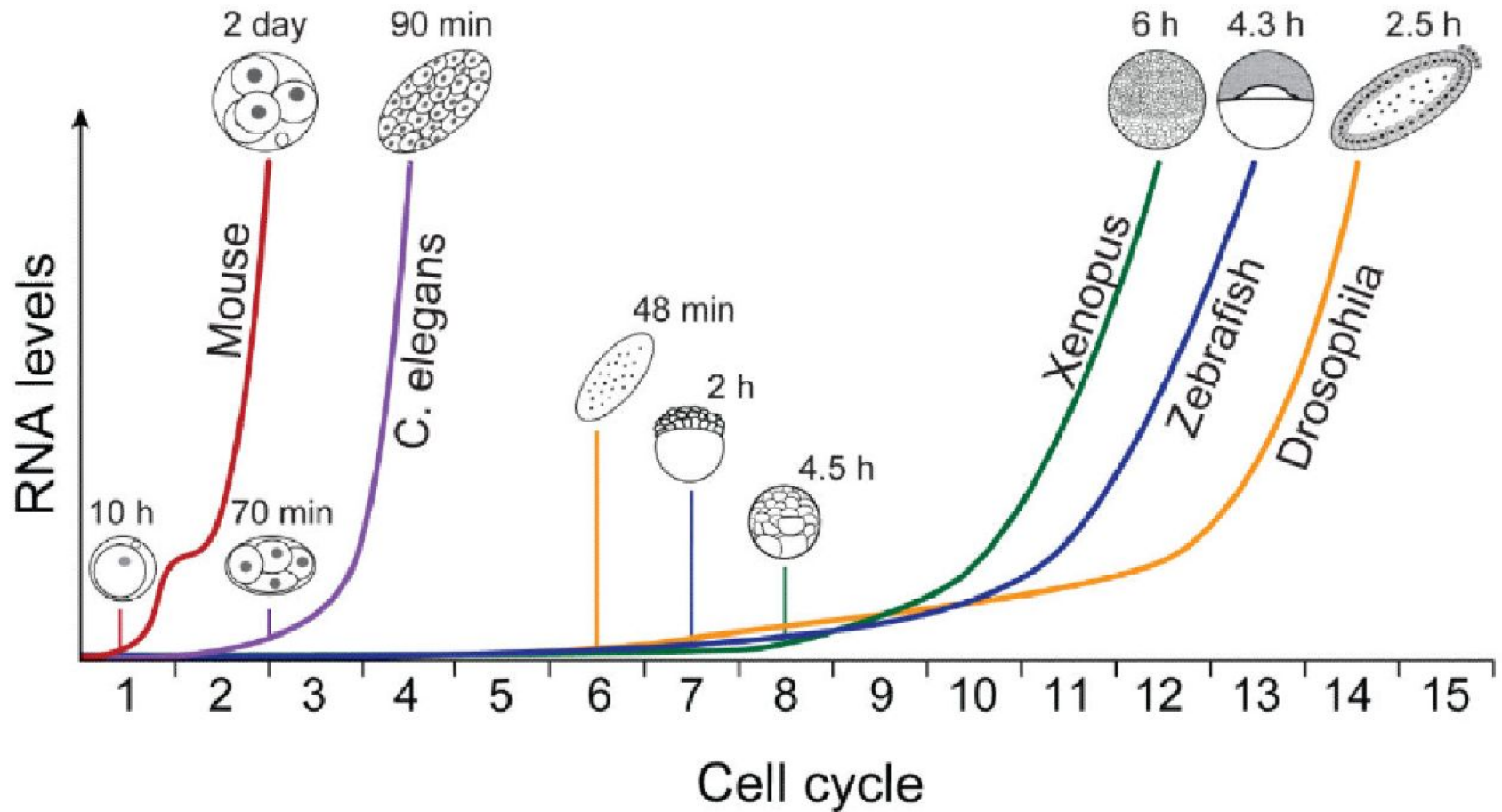
- начало активности генома зародыша;
- конец периода синхронных делений;
- конец периода коротких клеточных циклов;

EGT – early gastrula transition:

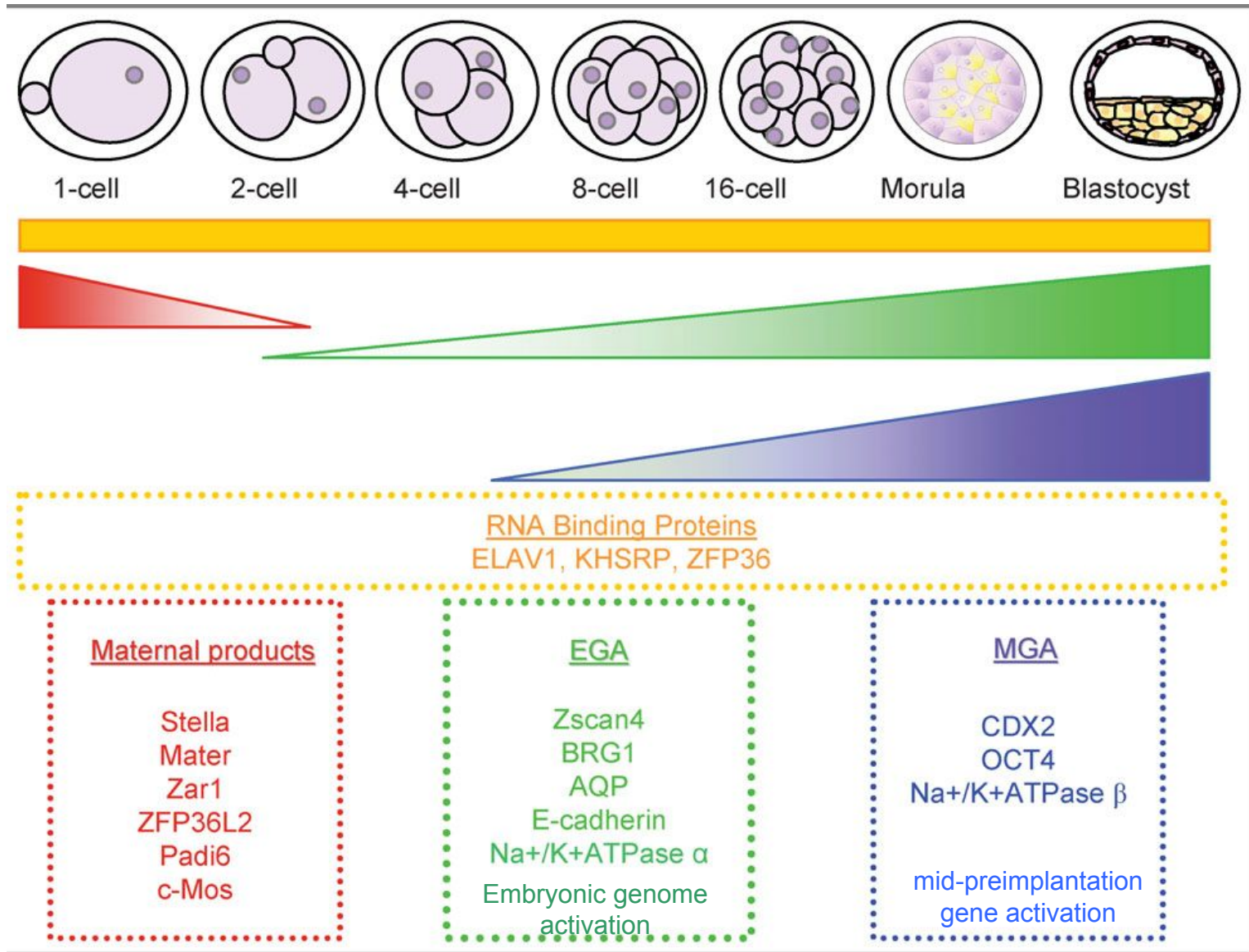
- завершение перехода на эмбриональные мРНК;
- возможна апоптотическая гибель клеток



Возрастание уровня РНК отражает активность собственного генома зародыша



Изменение экспрессии в раннем развитии эмбрионов мыши



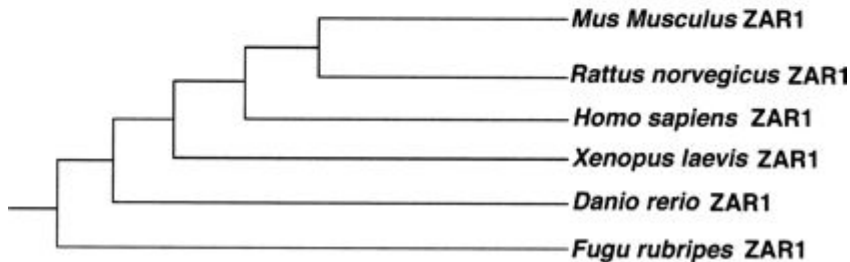
Активация генома эмбриона - участие материнских генов

Percent Identity of Entire ZAR1 Protein

	Human	Mouse	Rat	Frog	Zebrafish	Pufferfish	
Human		59.6	59.7	64.9	53.7	56.9	Human
Mouse	91.3		88.1	57.1	50.8	53.0	Mouse
Rat	93.3	98.1		59.2	51.8	55.7	Rat
Frog	97.1	90.3	92.3		66.1	61.6	Frog
Zebrafish	89.3	83.5	84.6	88.3		60.4	Zebrafish
Pufferfish	83.5	80.6	81.7	82.5	84.5		Pufferfish
	Human	Mouse	Rat	Frog	Zebrafish	Pufferfish	

Percent Identity of C-termini 103 aa of ZAR1 Protein

A



B

Филогенетическая дистанция между белками ZAR1 у разных видов позвоночных:

A) вверху справа: идентичность (%) всей аминокислотной последовательности; **внизу слева:** процент идентичности для 103 С-терминальных аминокислот (*zinc finger motif*)

B) Филогенетическое древо ZAR1 белков

ZAR1 – zygote arrest protein1

Zar1 - zygote arrest protein1

2008

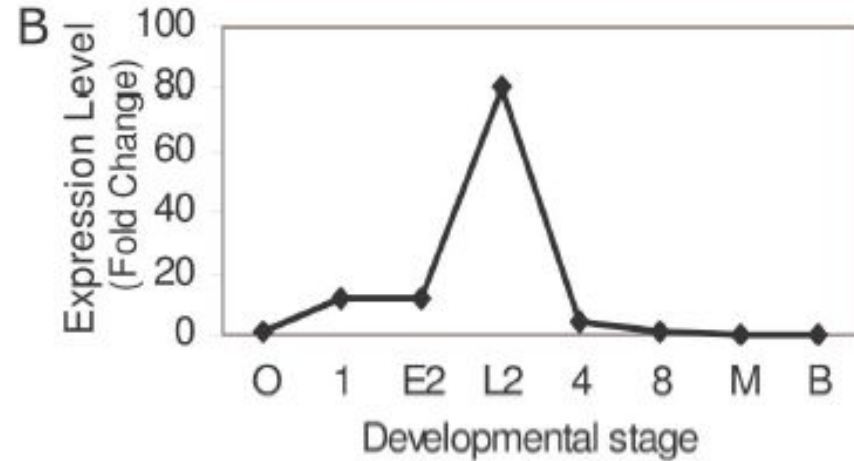
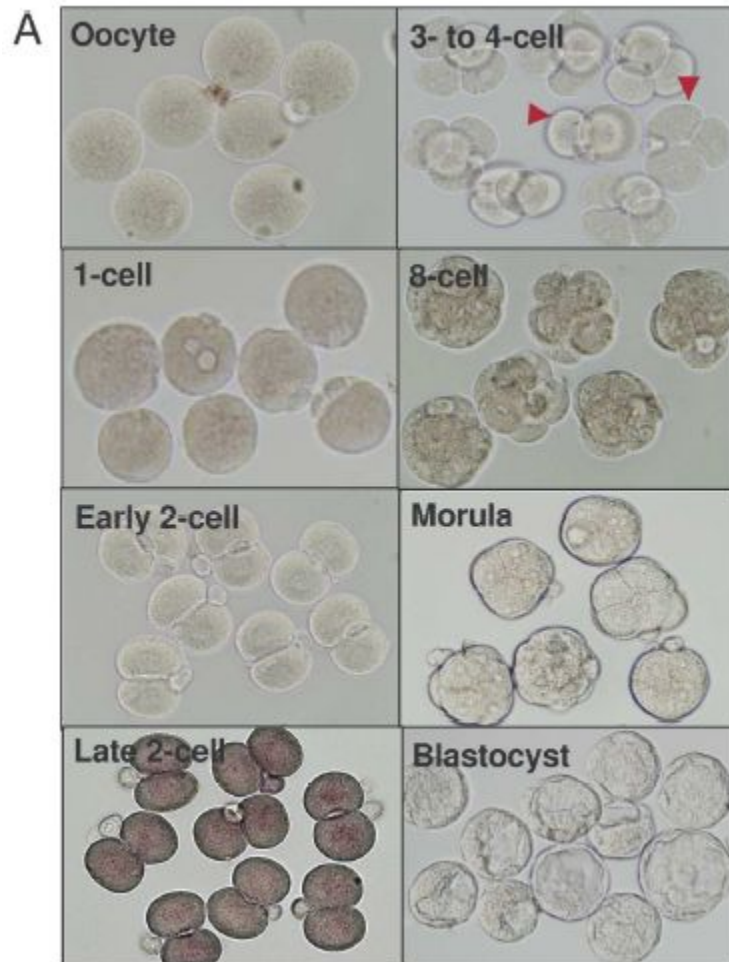
zag1 (zygotic gene activation-associated gene 1)

На стадии зиготы и на стадии 2-х бластомеров белок локализован в пронуклеусах и в ядре
Его количество постепенно уменьшается

Активация генома эмбриона – участие собственных генов

В последние годы – поиск генов, работающих *только* на поздней 2-х бластомерной стадии: “zygotic genome activation” (ZGA),

Zscan4 - zinc finger and SCAN domain containing 4



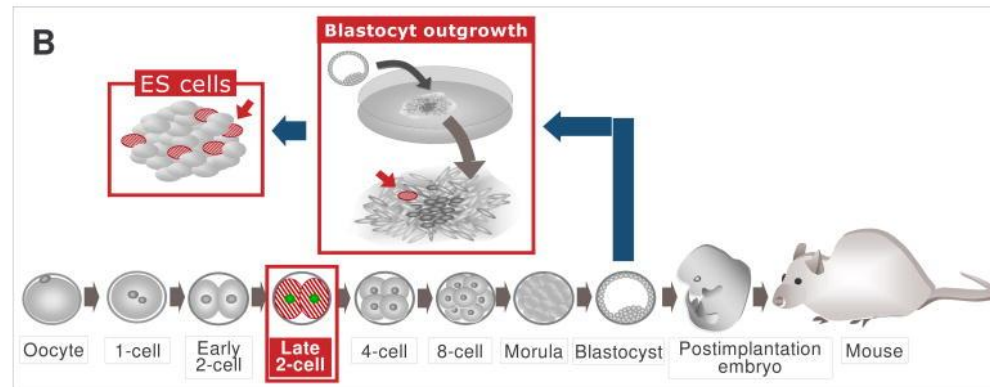
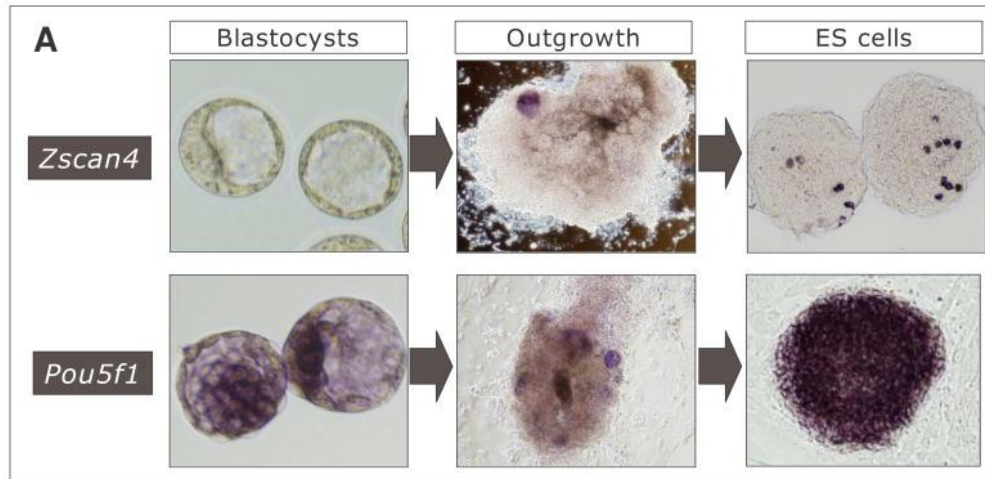
Профиль экспрессии **Zscan4** во время доимплантационного развития:

A: whole mount *in situ* hybridization;

B: qRT-PCR analysis

Zscan4 экспрессируется в течение короткого периода на поздней стадии 2-х бластомеров. shows a transient and high expression in the late 2-cell embryos. Такого высокого уровня экспрессии не обнаруживается ни в 3-х бластомерных эмбрионах (красные стрелки), не в 4-х бластомерных эмбрионах

Активация генома эмбриона - участие собственных генов



- A) Expressions of *Zscan4* and *Pou5f1* in the blastocysts, blastocyst outgrowth, and ES cells by the whole mount *in situ* hybridization.
- B) A schematic illustration of the *Zscan4* expression patterns [Dev Biol. 2007 July 15; 307\(2\): 539–550.](https://doi.org/10.1006/dbio.2007.3072)

У человека один ген *Zscan4*

У мыши – 6 работающих *Zscan4* и 3 псевдогена; из работающих 6-и 3 гена кодируют полноразмерный продукт 506ак длиной:

Zscan4d – транскрибируется на стадии 2-х бластомеров

Zscan4c - транскрибируется в ЭСК (ES) cells.

- Никакие транскрипты генов *Zscan4* не были обнаружены в других типах клеток
- Нокдаун *Zscan4* (инъекция siRNAs) задерживает переход от 2-х к 4-х клеточной стадии; бластоцисты, получившиеся из таких эмбрионов не способны имплантироваться или давать разрастания *in vitro*

Gene Information

POU5F1 POU class 5 homeobox 1 [Homo sapiens]

Also known as: DADB-104B20.2; MGC22487; OCT3; OCT4; OTF3; OTF4

POU domain (termed POU for its presence in the Pit-i, Oct-1/Oct-2, and Unc-86 genes)

Тотипотентность: **определения этого термина и ошибки его** **толкования**

- **Определение 1:**

Тотипотентность – способность клетки развиваться в целый организм

- **Определение 2:**

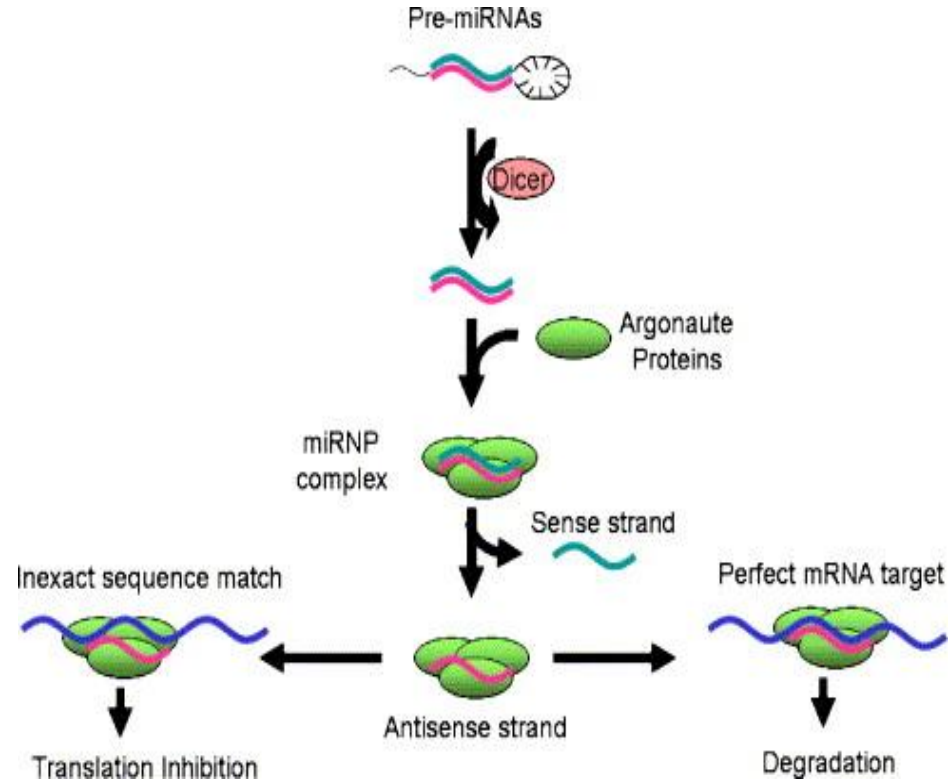
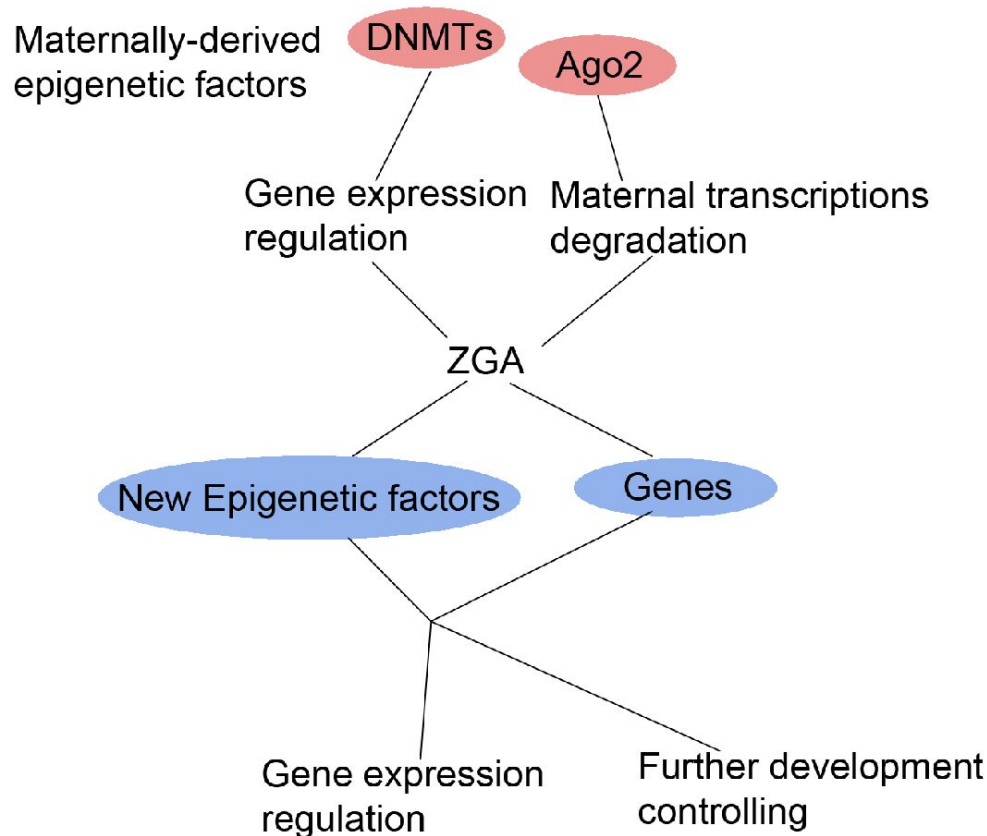
Тотипотентность - способность клетки давать все клетки и ткани организма

- **Определение 3:**

Тотипотентность - способность одной индивидуальной клетки (не группы клеток) давать нормальное развитие

- Приравнивание участия в развитии организма к способности независимого развития в целый организм
- Приравнивание способности группы клеток развиваться в полноценную особь к способности одной клетки делать то же самое
- Приравнивание экспрессии ранних эмбриональных маркеров к тотипотентности
- Приравнивание способности группы клеток формировать нечто, схожее с эмбрионом, к тотипотентности

Генетическая и эпигенетическая регуляция раннего развития

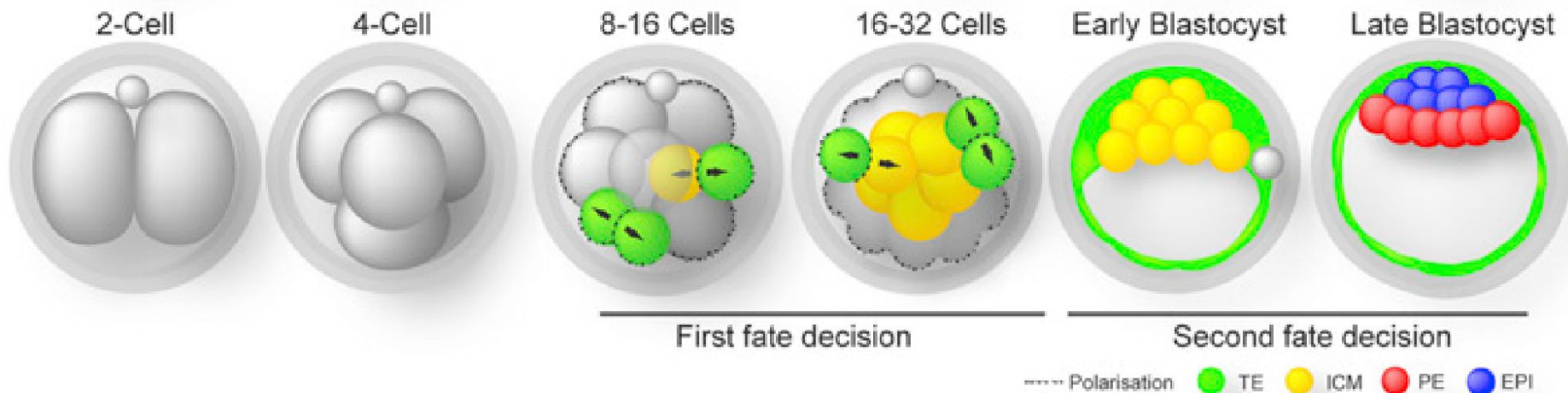


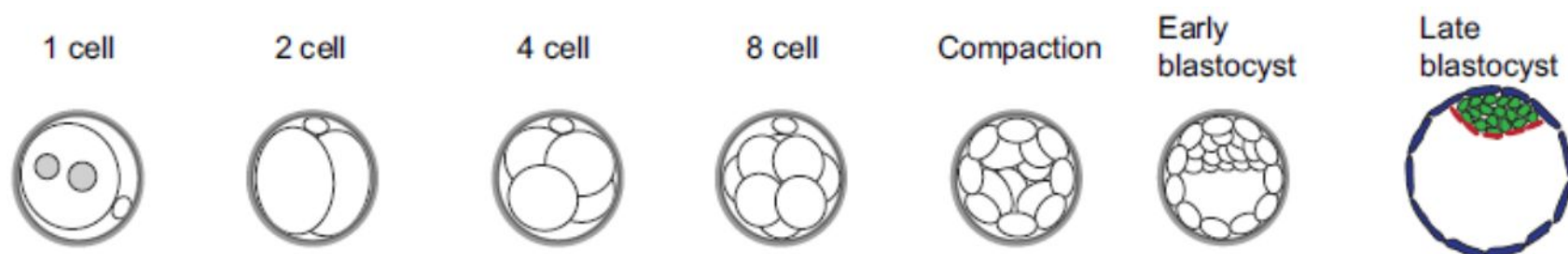
После оплодотворения некоторые эпигенетические факторы материнского происхождения (накопленные во время оогенеза), (в том числе DNMTs, Ago2) принимают участие в активации генома зиготы **“zygotic genome activation” (ZGA)**, и устанавливают статус работы генома зародыша при котором работают как белок-кодирующие гены, так и новые эпигенетические факторы, которые также принимают участие в дальнейшей регуляции генной экспрессии и от них также зависит наступление дальнейших стадий развития.

Выбор судьбы клетками раннего эмбриона: решение в 2 этапа

1 этап: внутри или снаружи (вопрос: за счет каких клеточных процессов клетки становятся ТЭ или ВКМ)

2 этап: как клетки внутренней клеточной массы разбираются на эпибласт и гипобласт





Maternal transcript accumulation

Minor gene activation

Embryo genome transcription

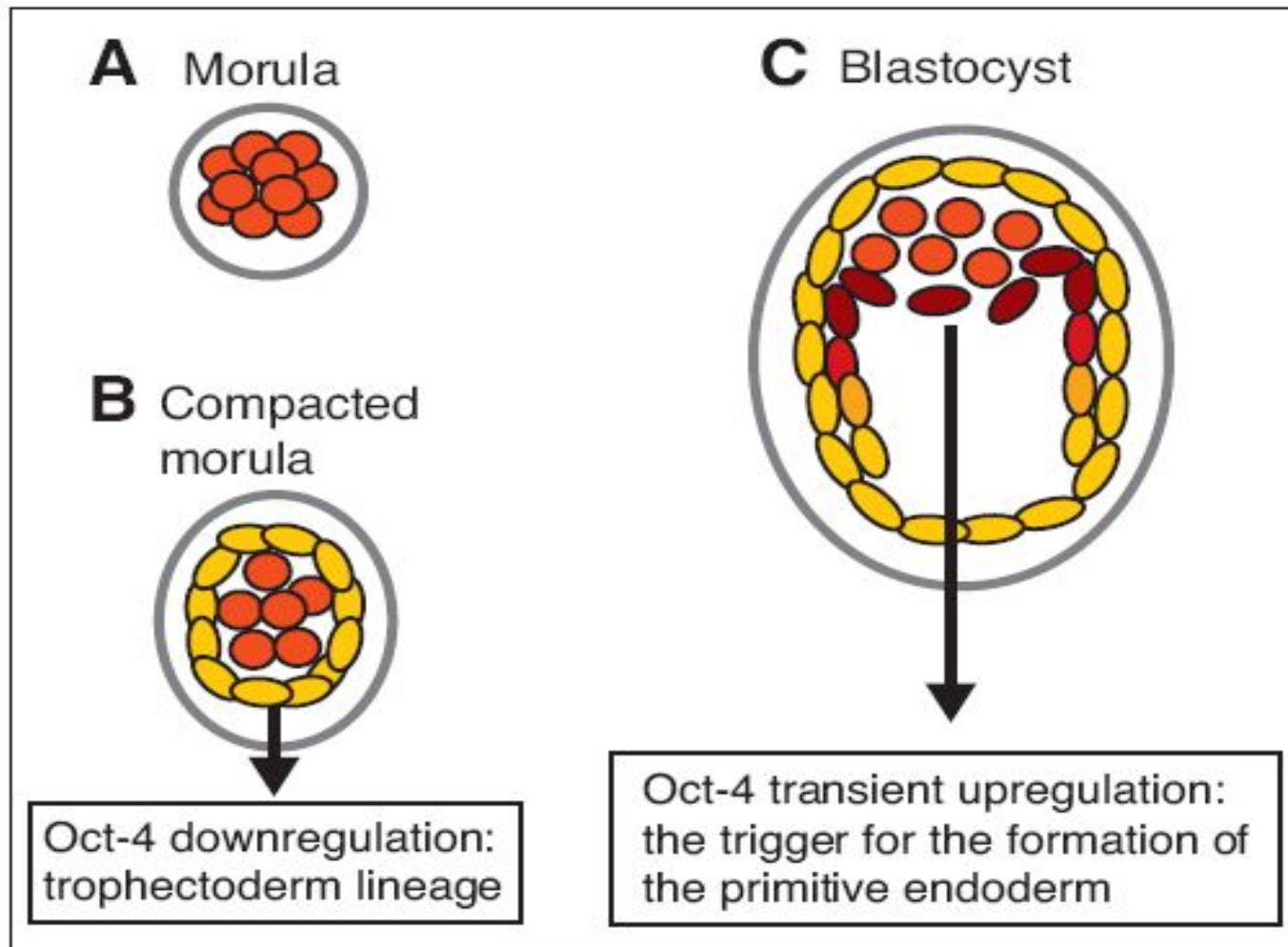
Lineage-associated gene expression

Epi gene expression

TE gene expression

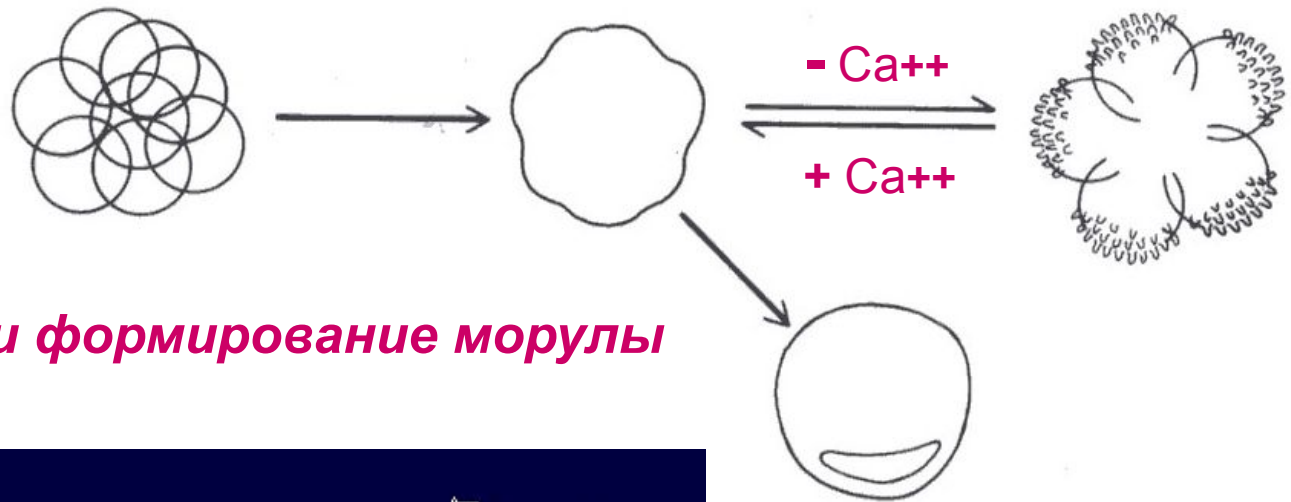
PE gene expression

Дифференцировка бластоцисты: OCT-4

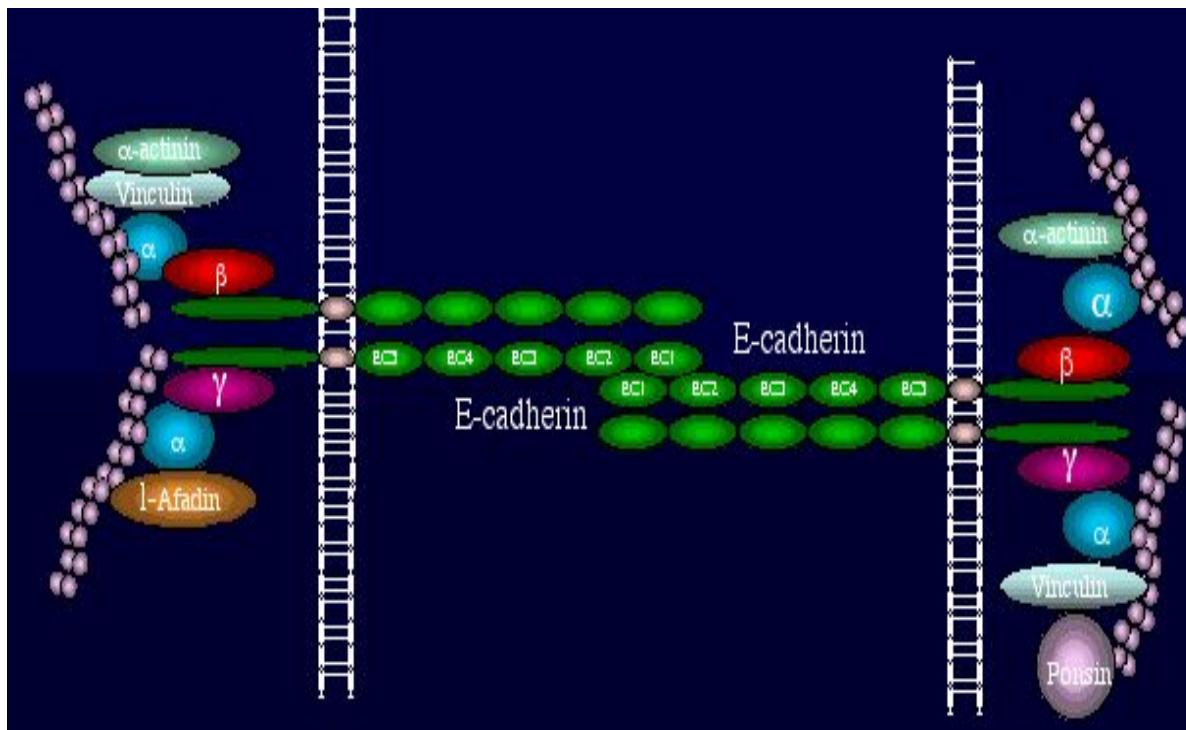


4-8 бластомеров

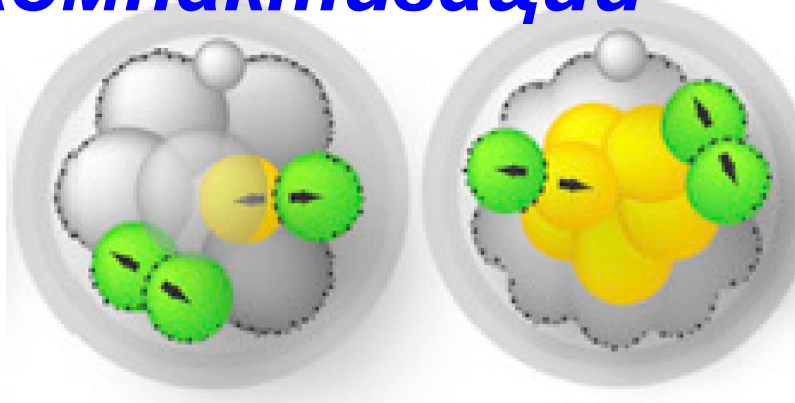
8-16 бластомеров



Компактизация и формирование морулы



Период компактизации



**Переход от 8 к 16
к 32**

Переход от 16

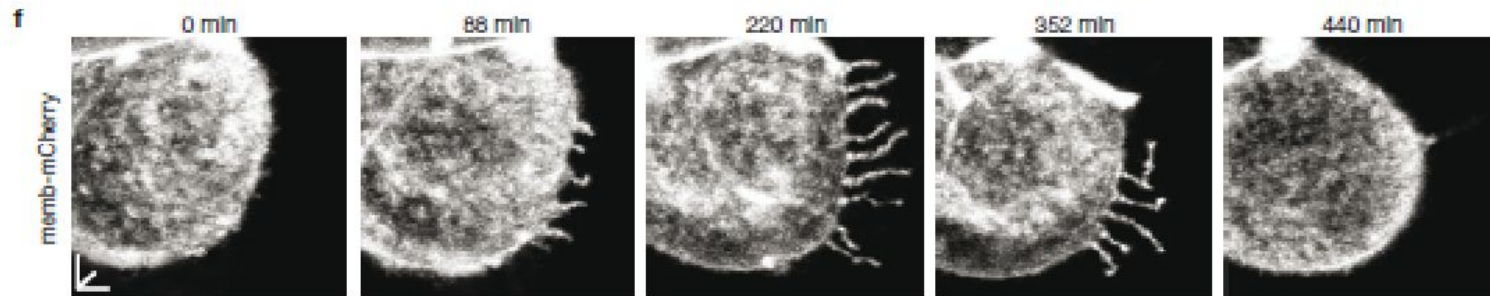
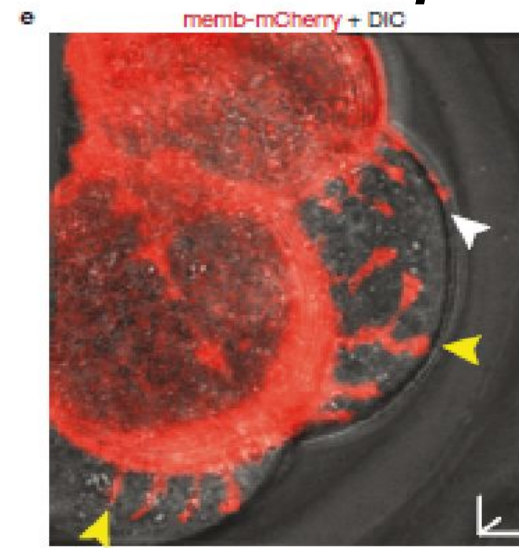
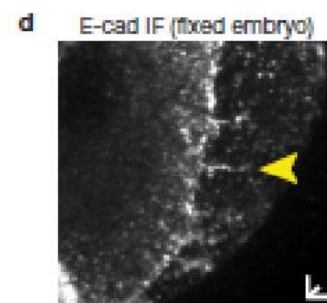
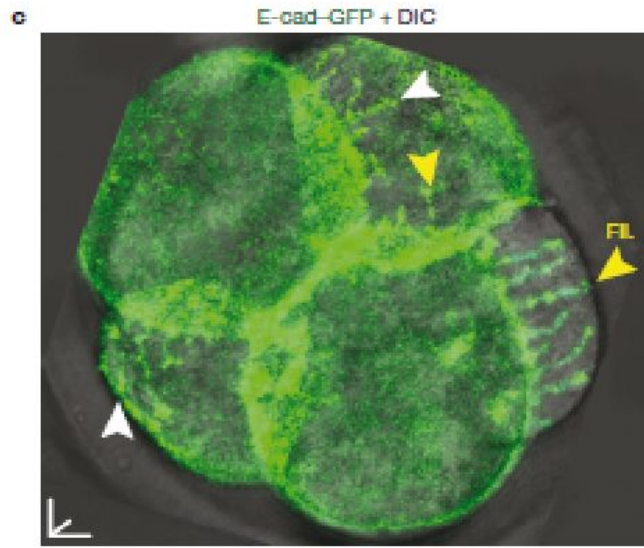
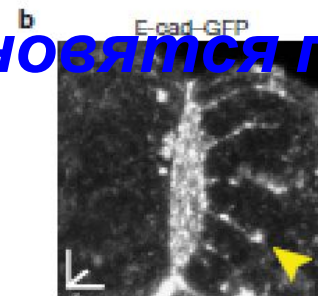
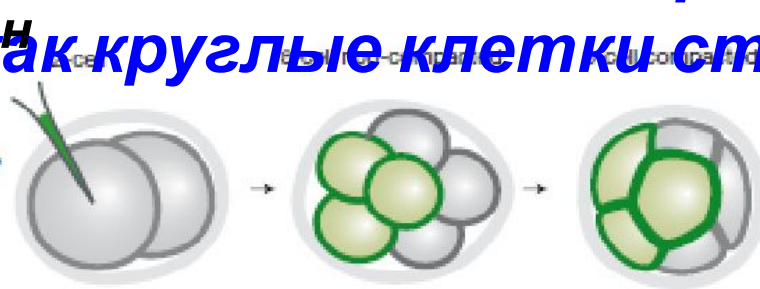
- **Клеток мало для формирования внутренней среды**
- **На обеих этих стадиях наружные клетки могут делиться давая как пару наружных потомков, так и пару наружный-внутренний**
- **Клетки “слишком круглые” – для формирования адгезивных контактов есть только точечные зоны контактов почти сферических**

Компактизация и поляризация клеток эмбриона:

как круглые клетки становятся плоскими?

Формируются
филоподии

Эмбрион
Ы
мышь

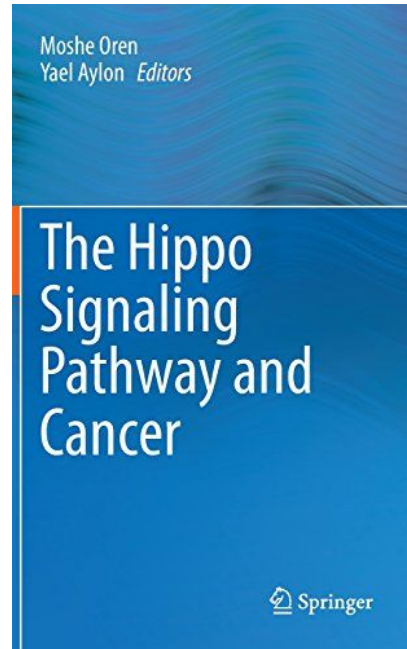
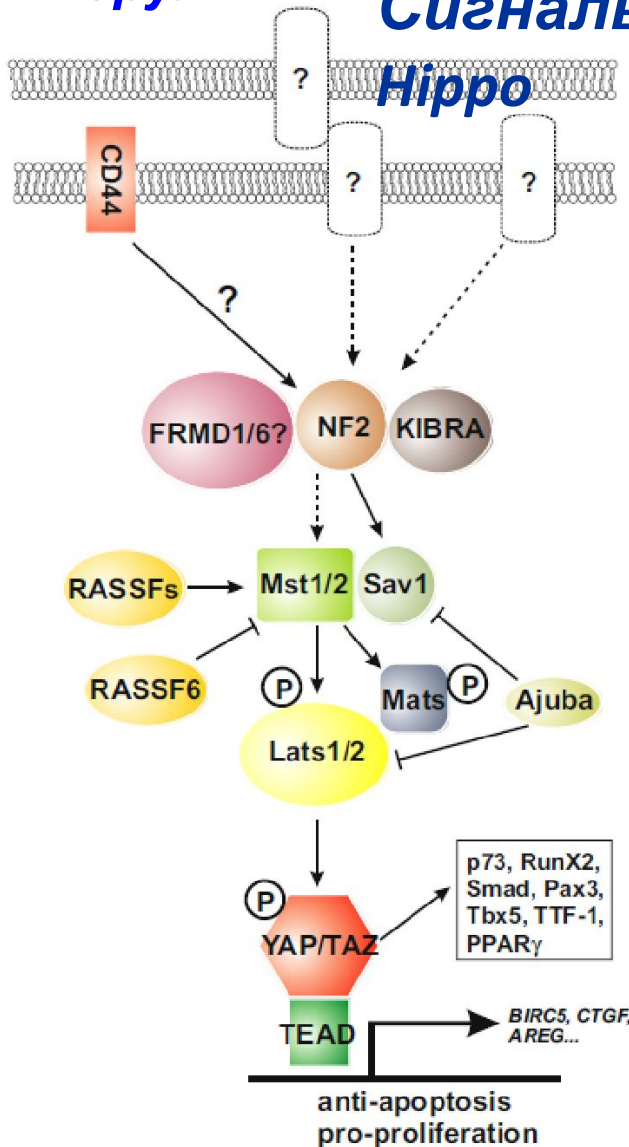


Time-lapse
microscopy

Fierro-González et al., Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction. Nature Cell Biol. 2013 Dec;15(12):1424-33

Как информация о положении бластомера транслируется в различные транскрипционные программы у внешних и внутренних клеток морулы?

Сигнальный путь протеин-киназы



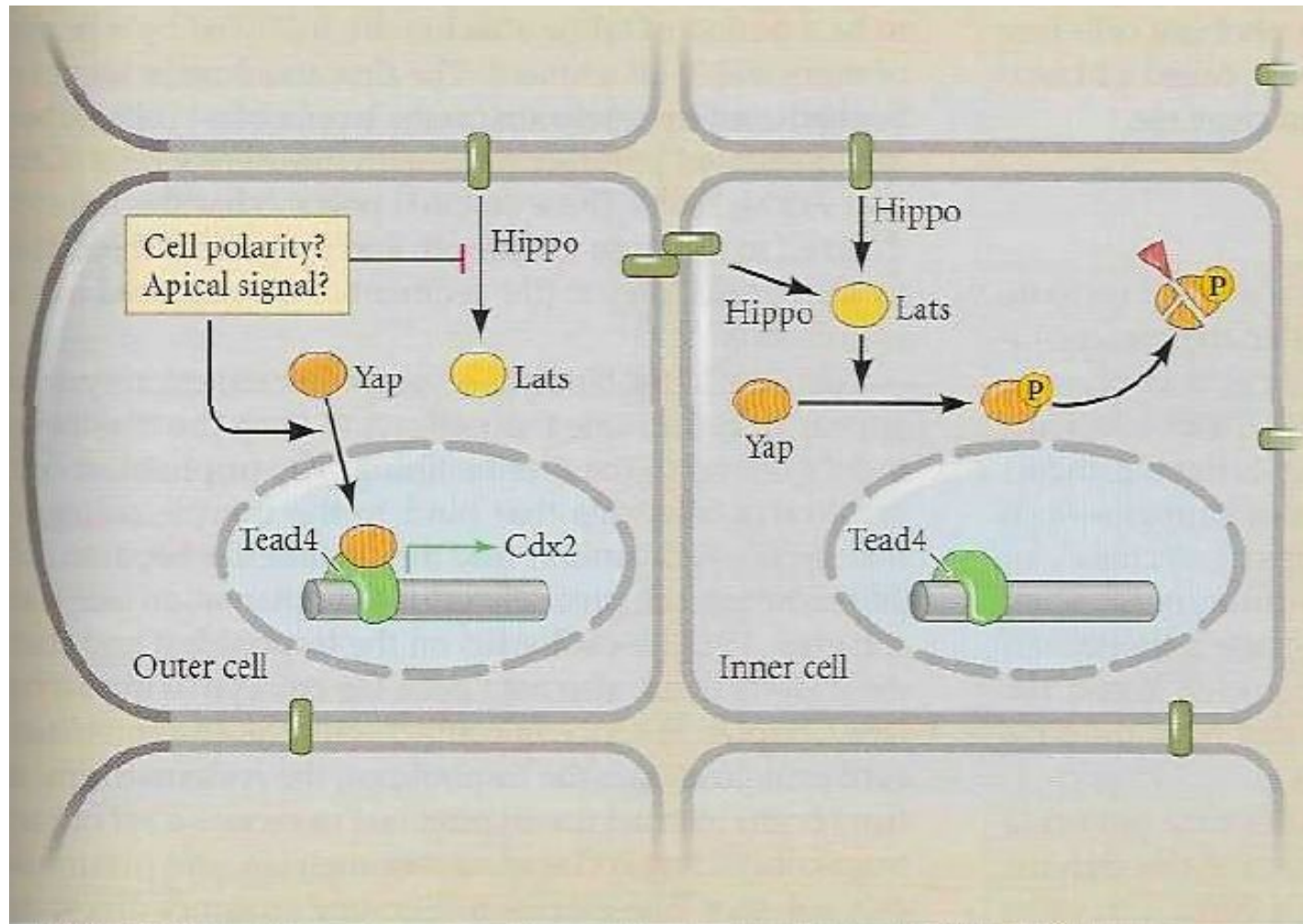
Размер печени

МЫШЦЫ: норм
сверхэкспрессия YAP



- Протеин-киназа Hippo (у млекопитающих называется Mst1/2);
- Этот каскад контролирует пролиферацию и апоптоз;
- Мутации в этом гене или в других генах каскада приводят к разрастанию ткани и увеличению размера органа (Hippo – hippopotamus);
- Активный каскад Hippo приводит в фосфорилированию белка YAP1 – в результате он уходит из ядра и деградирует.
- Разрушается комплекс YAP/TEAD и блокируется экспрессия ряда генов.

Нippo сигналинг: преобразование позиционной информации в молекулярный каскад



Gata3 – ранний маркер
клеток ТЭ

Oct4, Sox2 – ранние маркеры
клеток ВКМ

Становление полярности эмбриона на стадиях дробления: апикально-базальные различия в строении кортикального слоя.

● Baz, Par-6, aPKC, Cdc42
● Lgl

● aPKC, Cdc42
● Baz
● Par-1, Lgl, Scribble

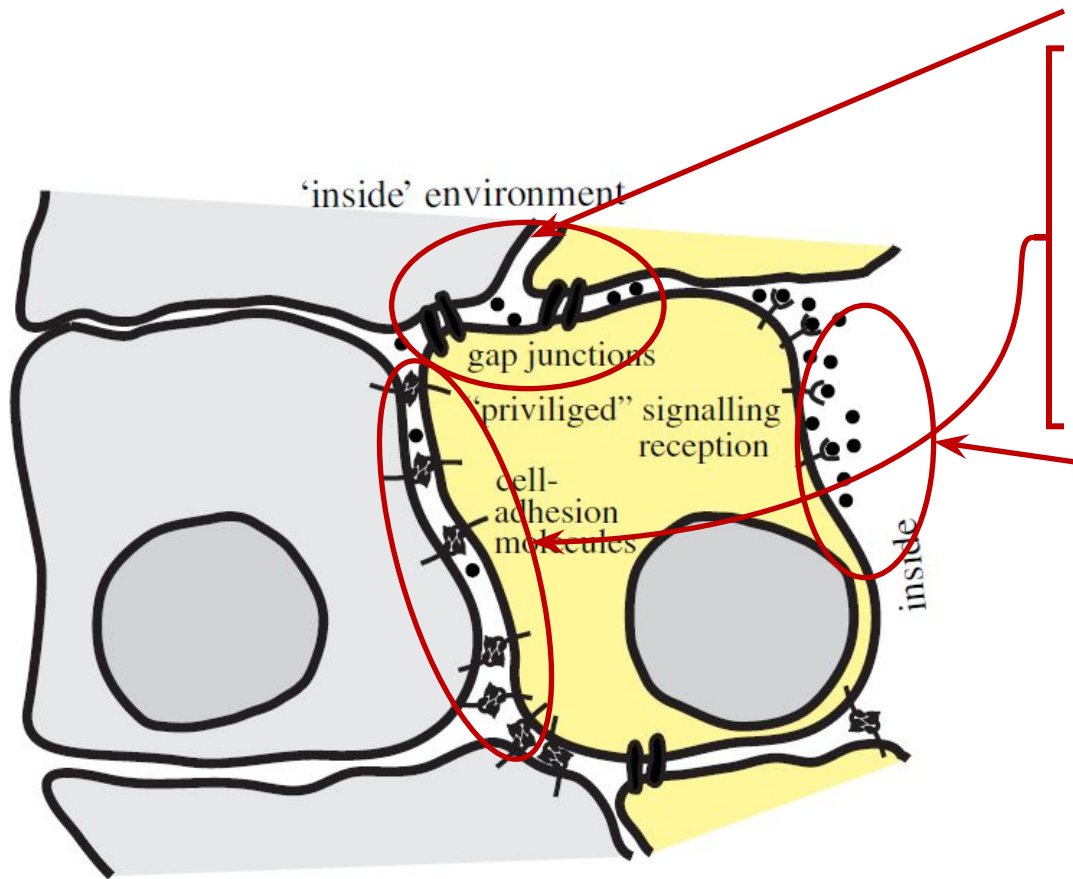
● Par-3, Par-6

● Par-3, Par-6, aPKC
● Par-1/EMK1, Lgl-1,
Scribble

Ніпро сигналінг недостаточен, необходима «внутренняя» среда

Эксперименты на трансгенных животных:

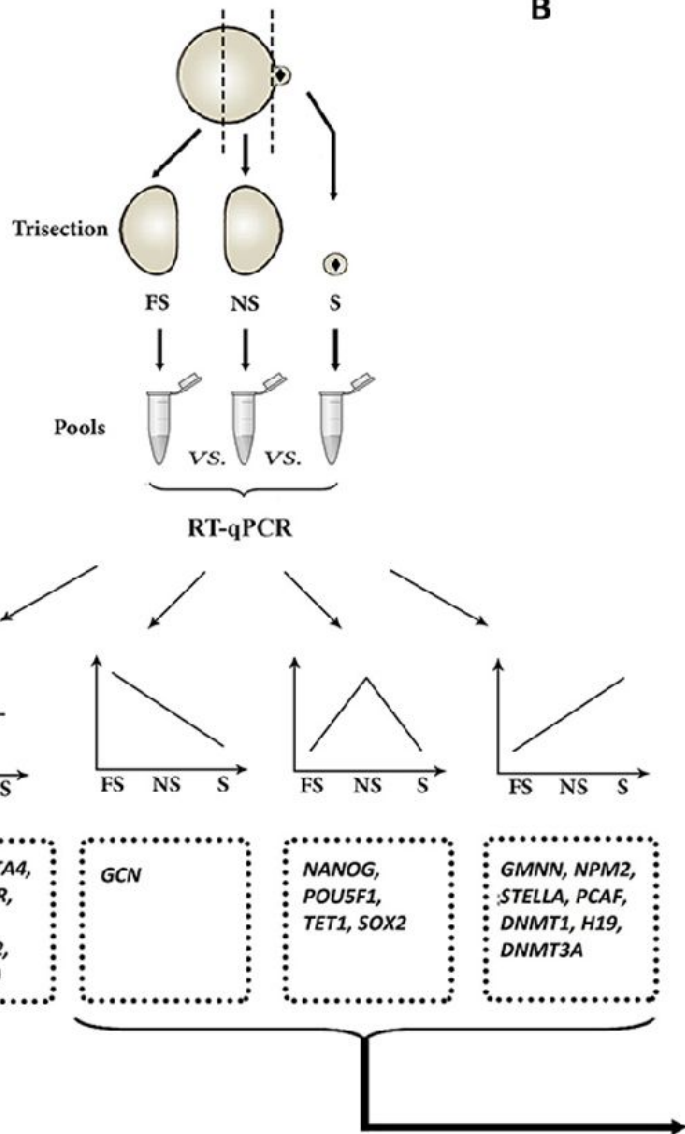
- Оверэкспрессия *Nf2* неспособна изменить локализацию Yap в трофэктодерме.
- Нокадаун *Lats1/2* проводит к эктопической экспрессии *Cdx2* в ВКМ, но экспрессия *Oct4* и *Nanog* сохраняется.



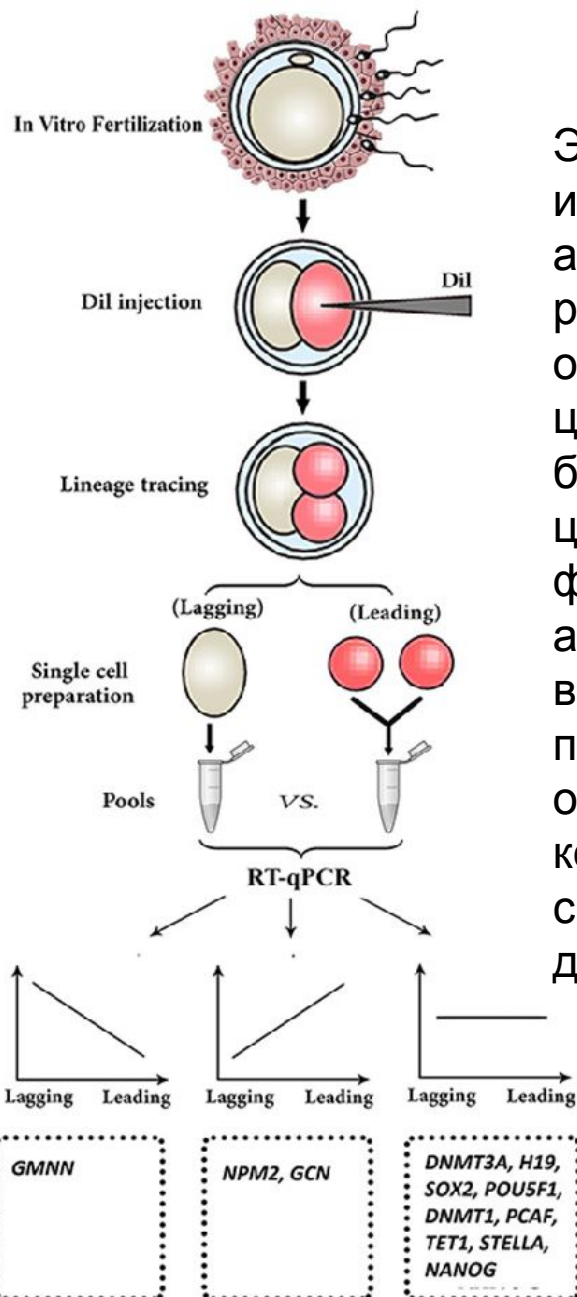
- Щелевые контакты
- Адгезионные контакты → сигналинг через цитоплазматические тирозин-киназы
- Фокальные контакты → сигналинг через FAK
- Внутренние клетки занимают привилегированную позицию для получения сигналов из внутренней среды
- Базальная мембрана или некий её аналог?

Дробление клеток раннего эмбриона: насколько клетки идентичны?

A

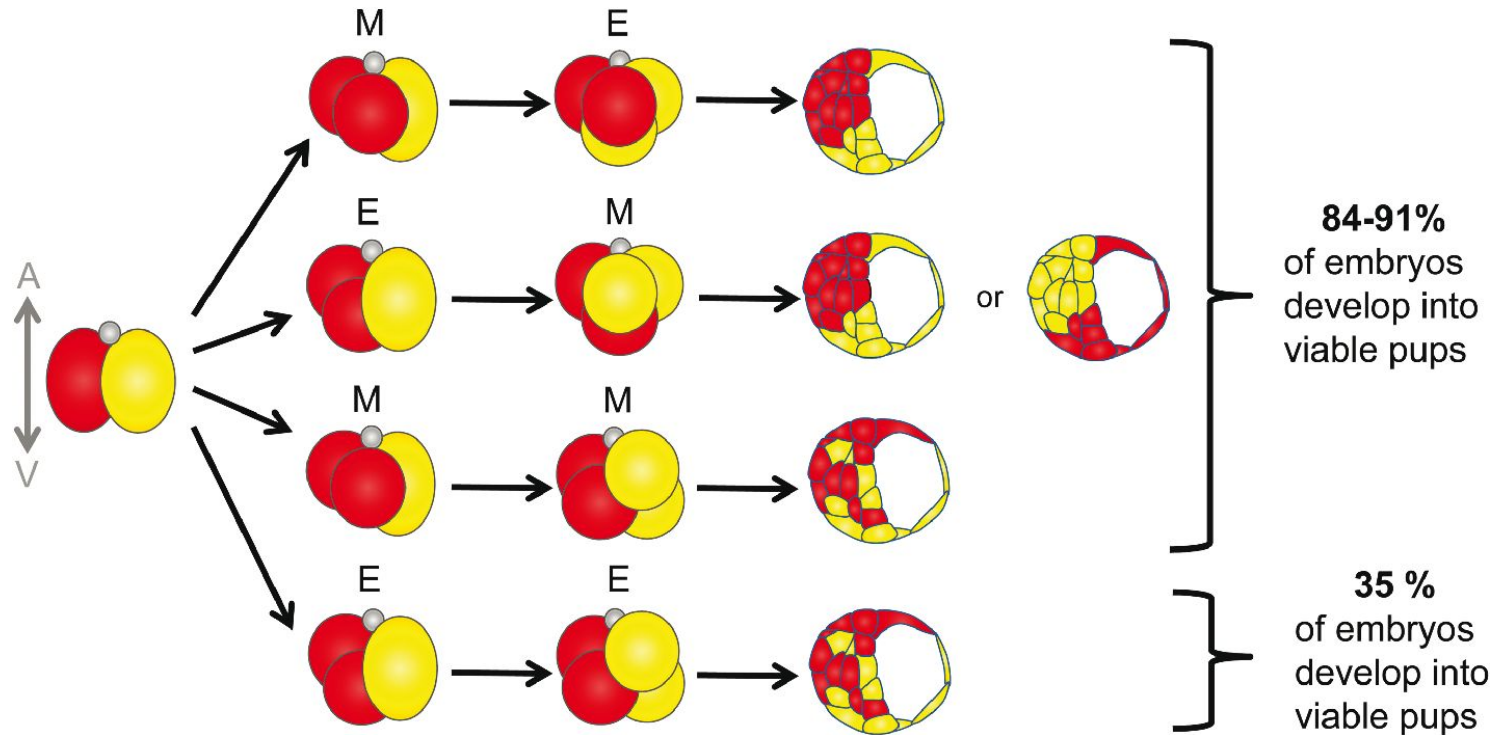


B



Эксперименты по исследованию асимметрии ооцита и раннего эмбриона овцы показали, что в цитоплазма (и в бластомерах в цитоплазматических фрагментах) анимальной и вегетативной позициях имеют отличия по количественному содержанию важных для развития РНК.

Влияние паттернов дробления на жизнеспособность эмбрионов



Cleavage patterns of mouse embryos at 2- to 4-cell transition. Two-cell stage mouse blastomeres divide either meridionally (M) or equatorially (E) giving rise to four types of embryos: ME, EM, MM and EE. Depending on the cleavage plane, progeny of the blastomeres populate different regions of the blastocyst (for details, see the main text). Moreover, embryos, which underwent at least one meridional division (ME, EM and MM), develop to term significantly more efficiently than EE embryos. A, animal pole; V, vegetal pole.

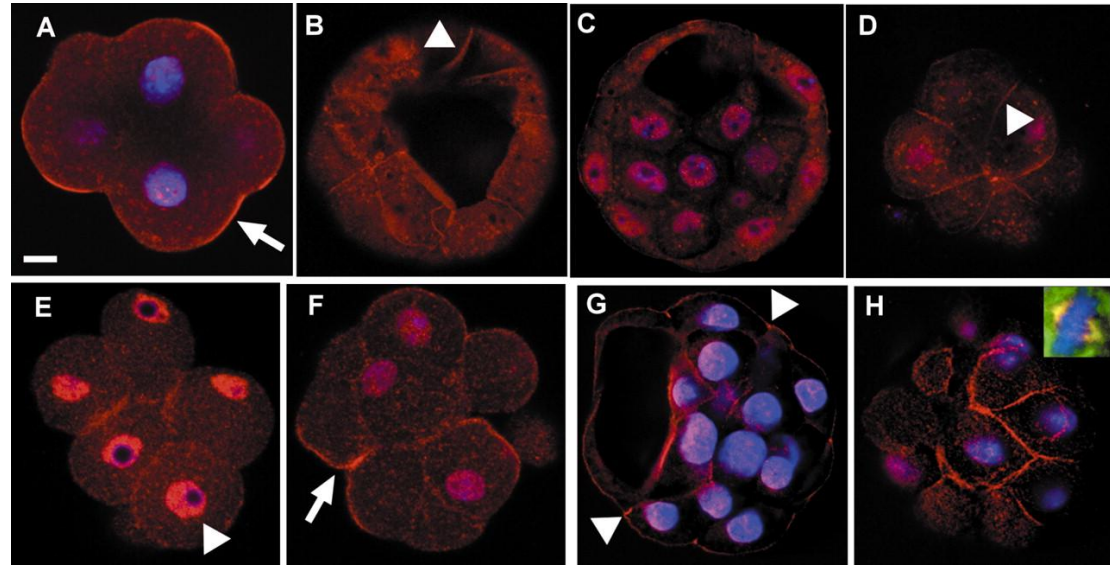
(Piotrowska-Nitsche and Zernicka-Goetz, 2005).

Гипотеза «Внутри- снаружи»

Асимметричная
локализация в клетках:
aPKC, Par3 и ezrin

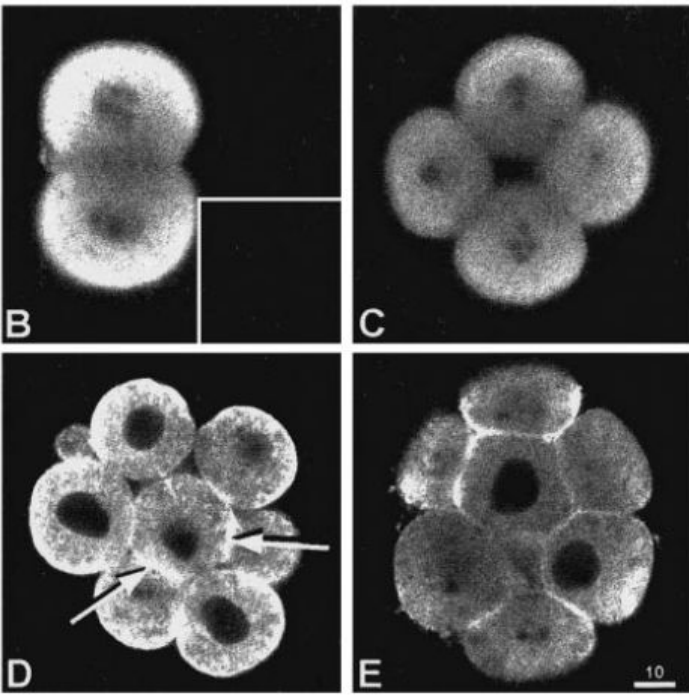
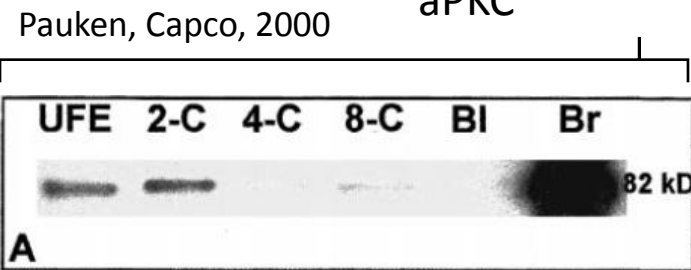
Plusa et al., 2005

aPKC



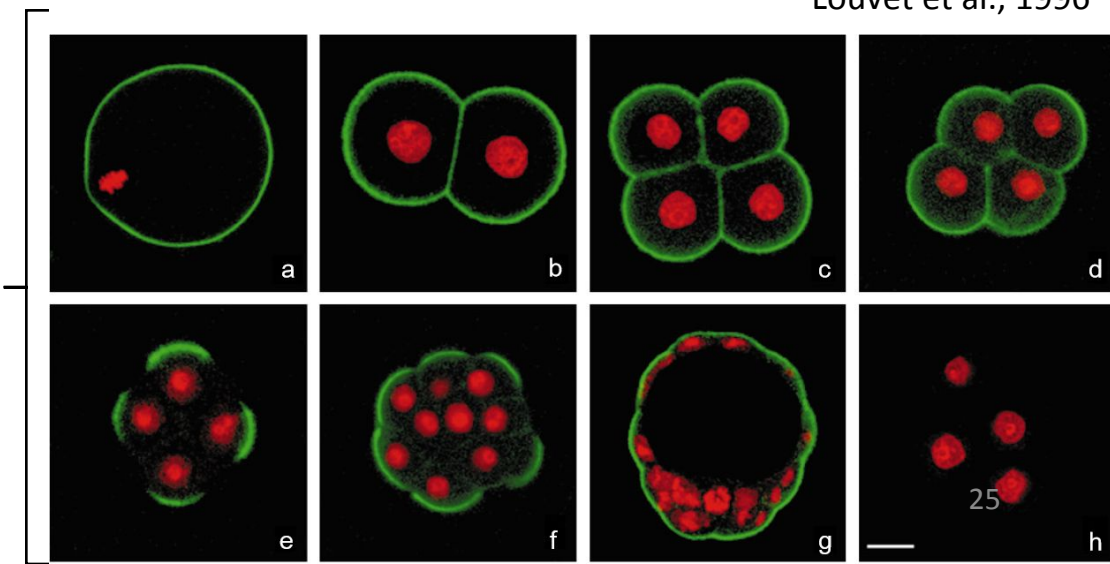
aPKC

Par3

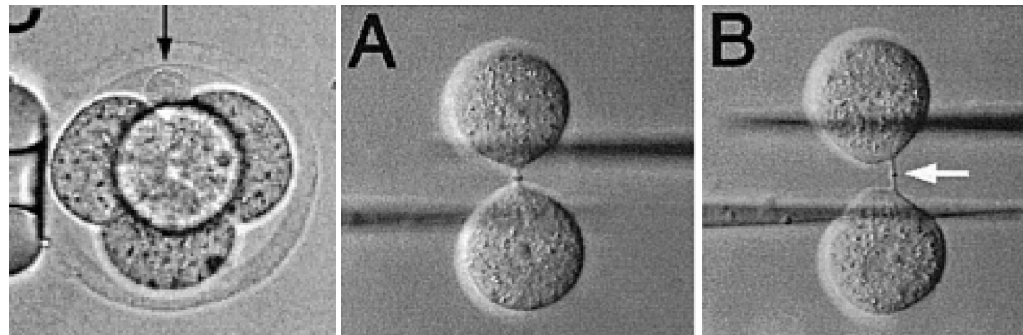
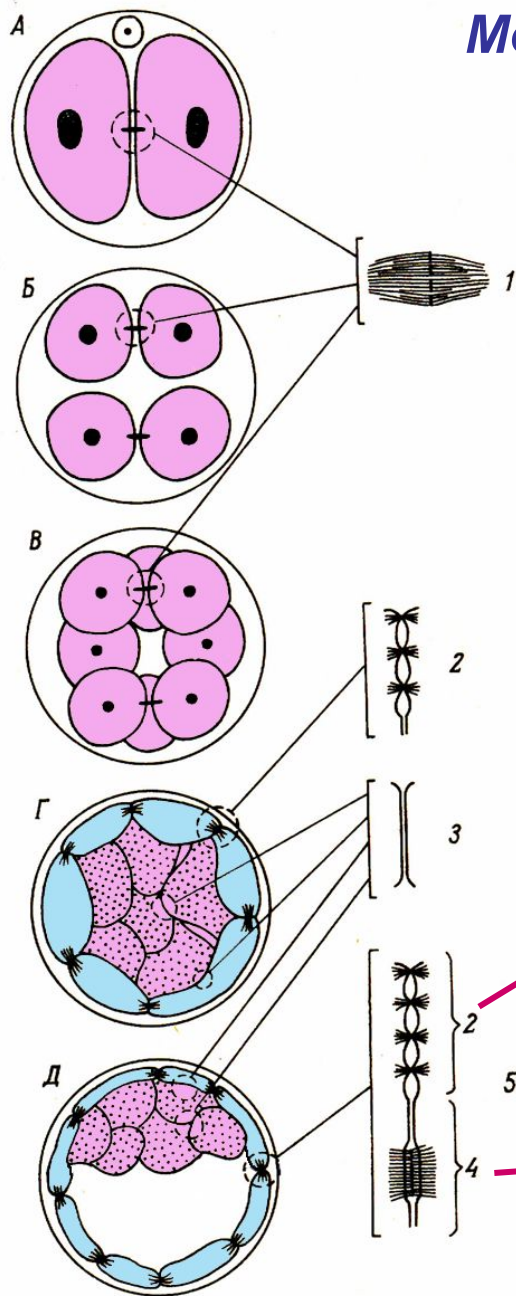


ezrin

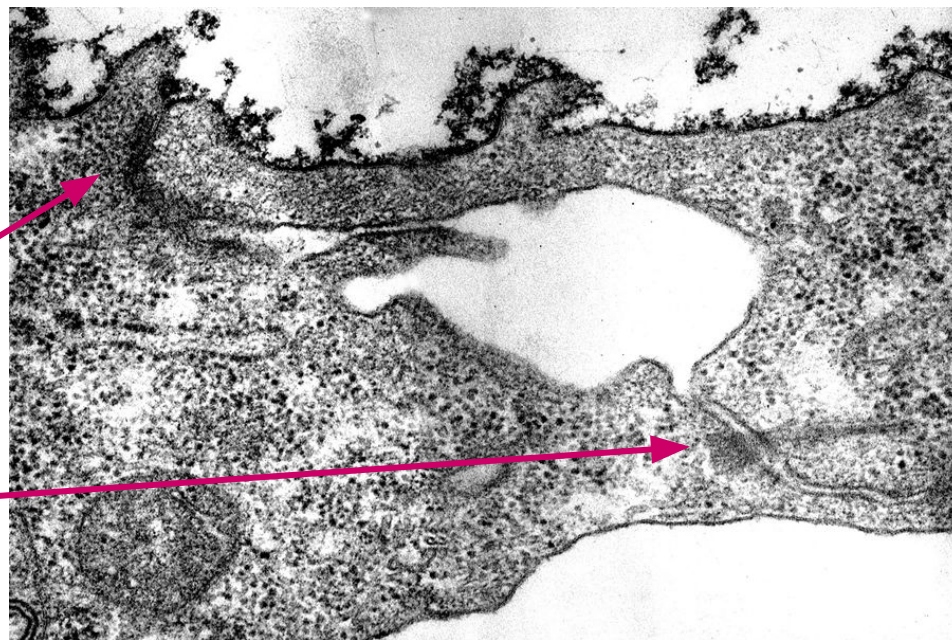
Louvet et al., 1996



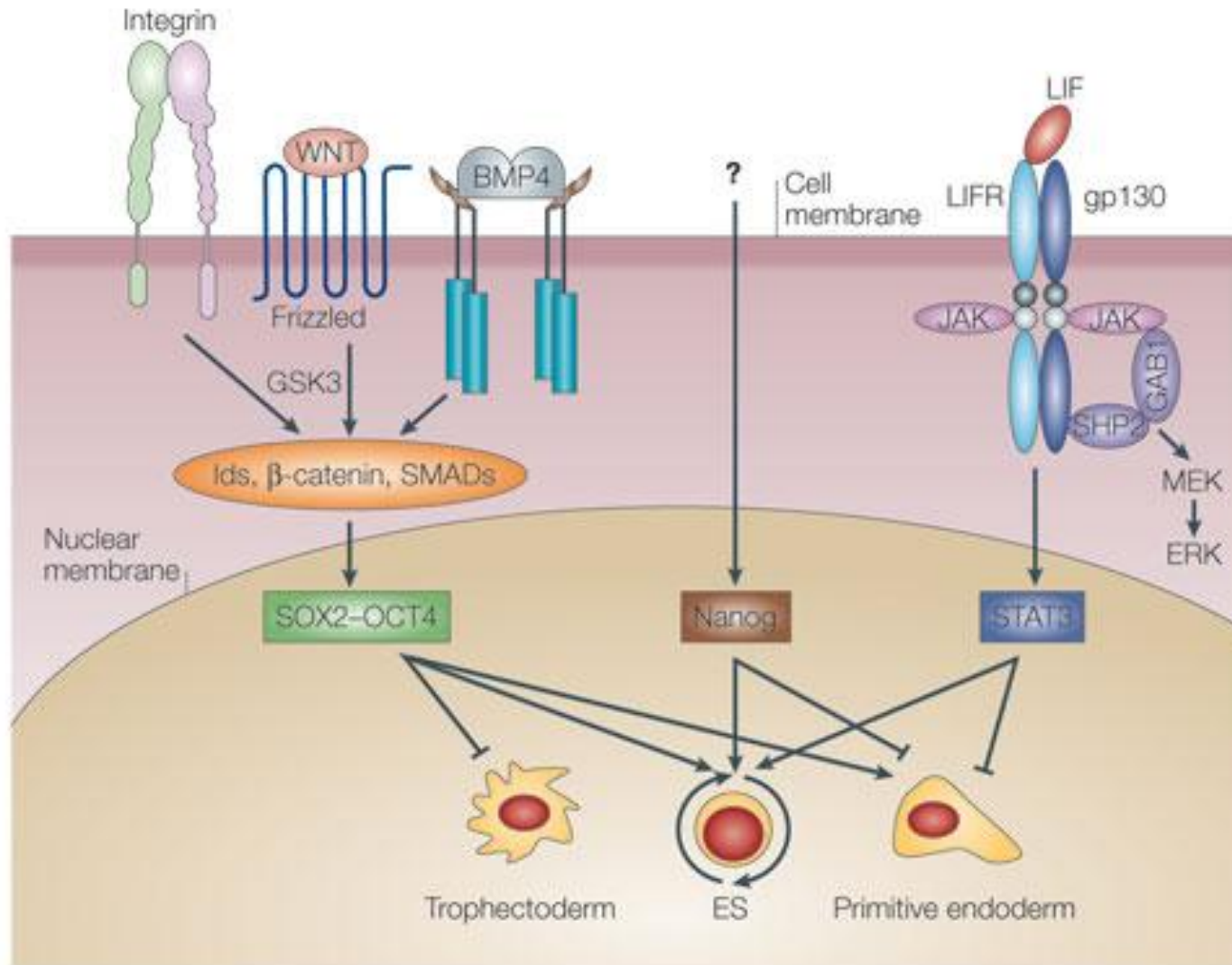
Межклеточные контакты в дробящихся эмбрионах, моруле и бластоцисте



Gardner, 2002



Поддержание плюрипотентности ES клеток в бластоцисте – сигнальные пути

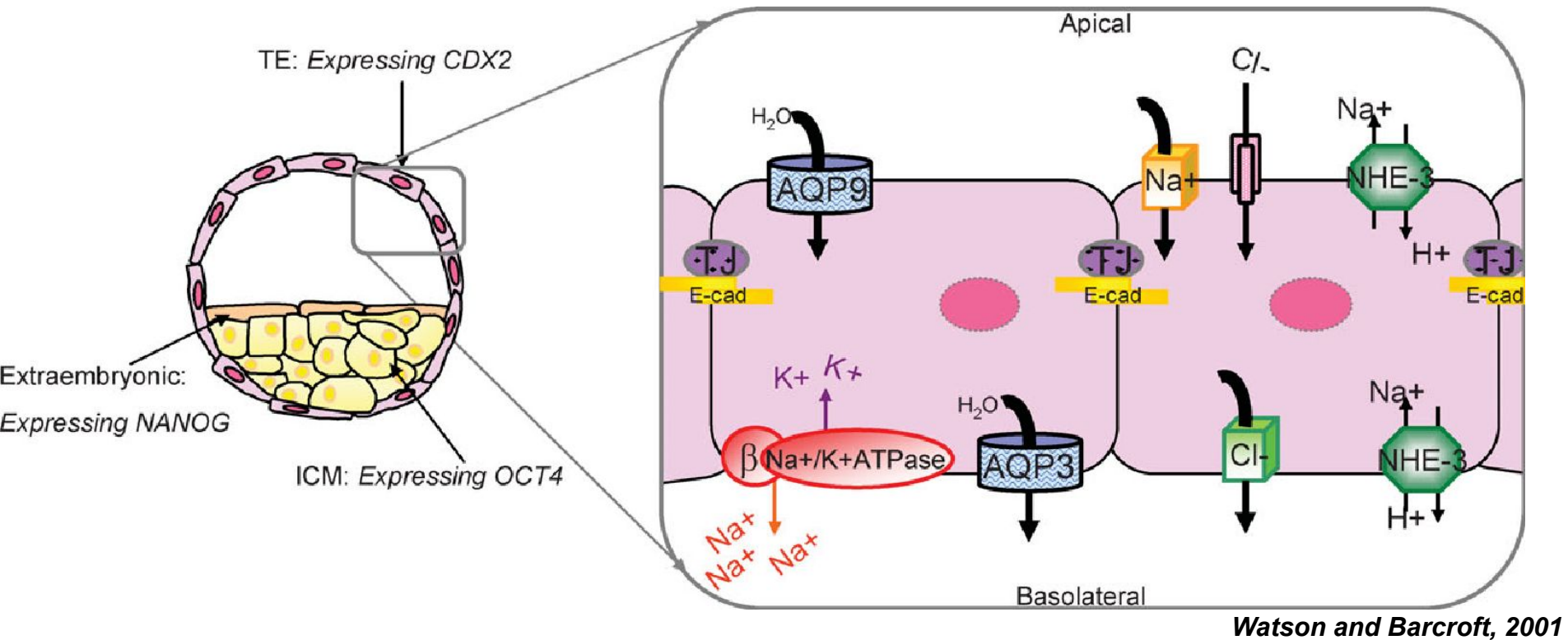


Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

REGULATORY NETWORKS IN EMBRYO-DERIVED PLURIPOTENT STEM CELLS

Michele Boiani & Hans R. Schöler *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 872-881 (2005); doi:10.1038/nrm1744

Трофэктодерма: транспорт ионов и молекул воды



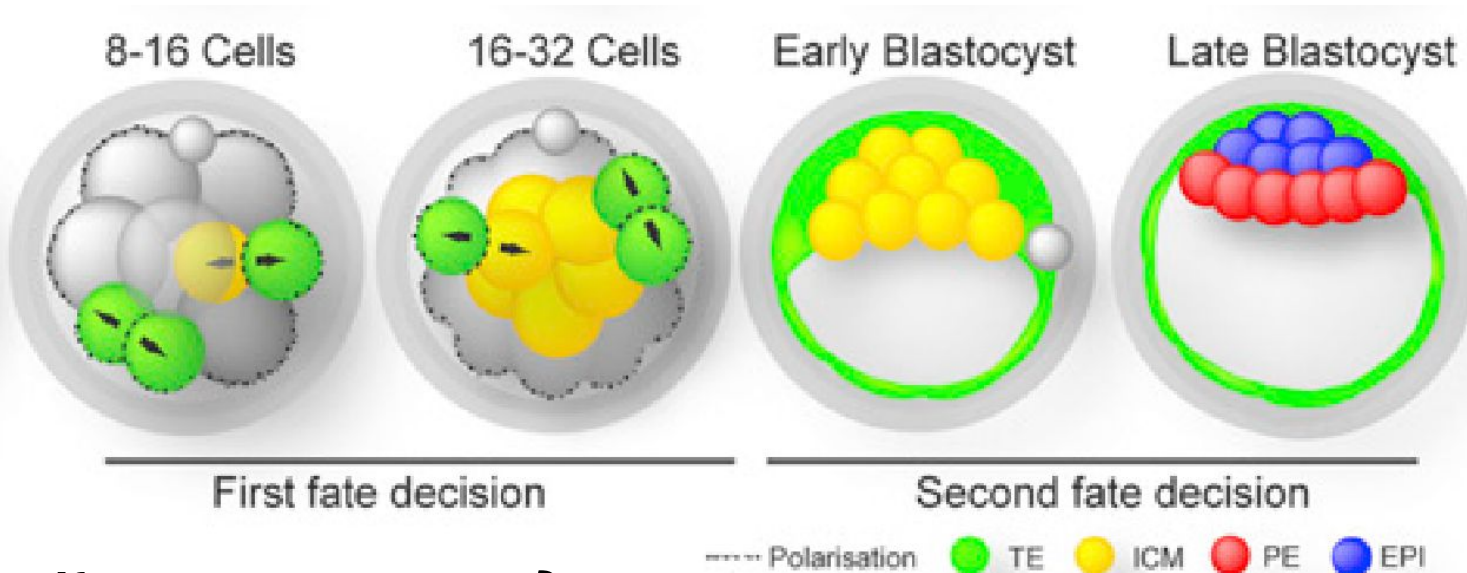
Na/K-АТРаза, AQP (аквапорины) и белки плотных контактов (TJ) играют основную роль в кавитации и формировании бластоцисты:

- Формирование бластоцисты зависит от поляризации распределения Na/K-АТРа1b1азы (базолатеральные мембраны клеток трофэктодермы).
- В результате устанавливается транс-трофэктодермальный градиент ионов
- ионный градиент способствует переносу молекул воды через эпителизованную трофэктодерму через апикальные и базолатеральные AQP-поры.
- Зона плотных контактов препятствует выходу воды наружу
- следствие – появление и последующее увеличение полости бластоцисты

Caudal-related homeobox 2 (Cdx2)

(E-cad, E-cadherin; NHE-3, sodium–hydrogen exchanger 3)

Второй этап выбора судьбы (для внутренних клеток): разделение на эпибласт и гипобласт

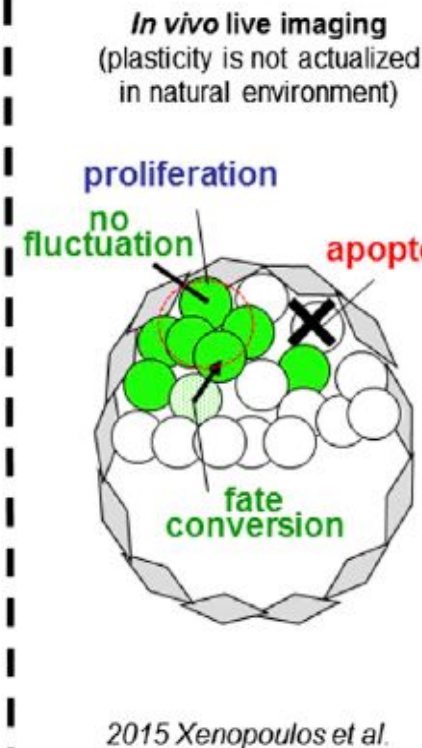
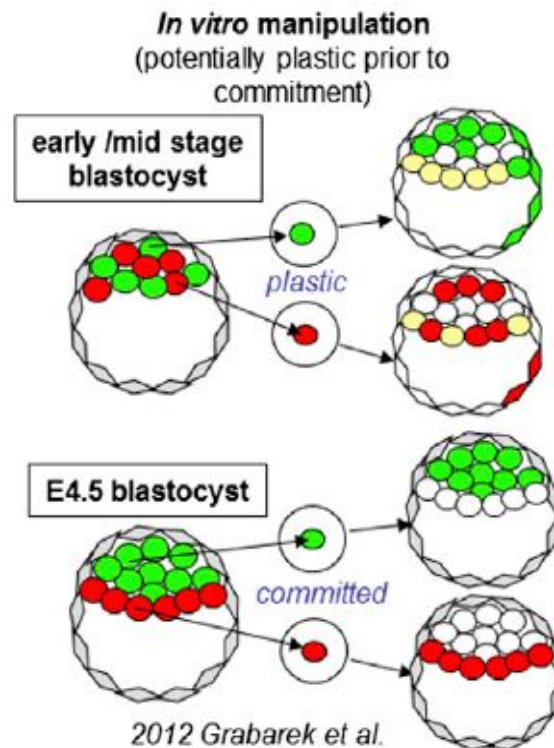
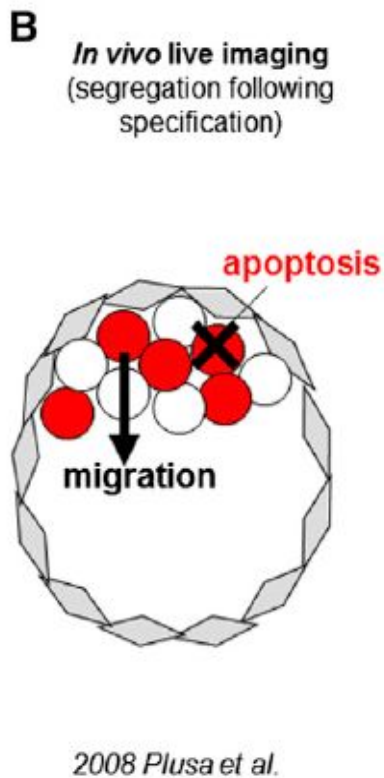
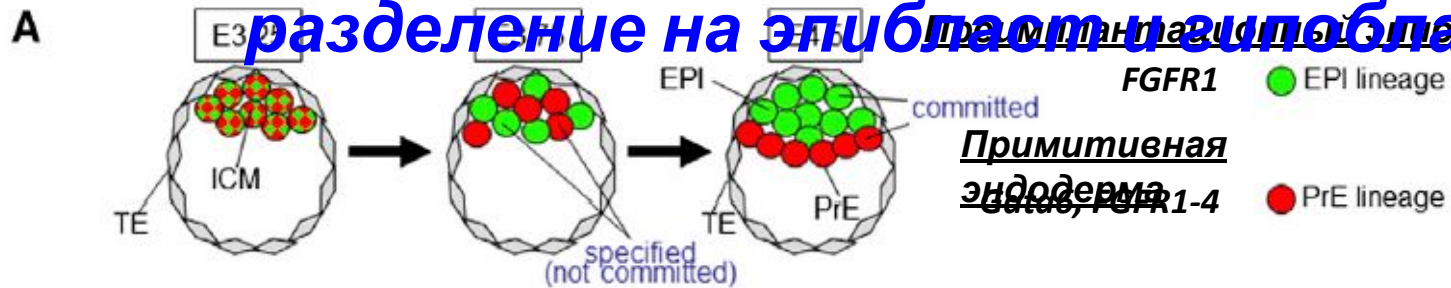


Классические представления:

- В ранней бластоцисте все клетки ВКМ с самого начала различаются по положению, в результате они приобретают молекулярные и морфологические различия;
- Те клетки, которые контактируют с полостью бластоцисты, быстро приобретают апикально-базальную полярность и становятся гипобластом;
- Клетки, которые не контактируют с полостью не поляризуются и становятся клетками эпибласта. Они дольше сохраняют недифференцированный статус (ЭСК происходят именно из таких

Второй этап выбора судьбы (для внутренних клеток):

разделение на эпибласт и гипобласт



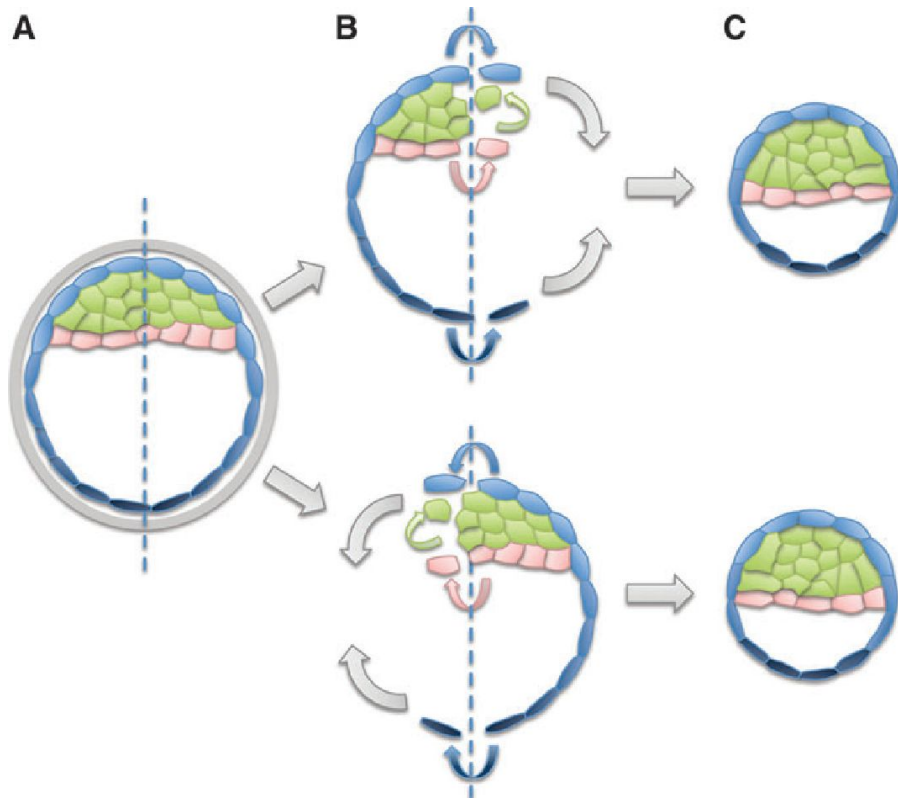
• 2008: PrE -

предшественники первичной энтодермы (гипобласта) мигрируют к полости бластоцисты; клетки которые ошиблись и не сумели занять правильную позицию уходят в апоптоз

• 2012 – в ранней бластоцисте, EPI-предшественники и PrE-предшественники могут менять свою судьбу, если в них активировать экспрессию специфических (для альтернативной судьбы) маркеров

• 2015 – очень редко предшественники PrE превращаются в EPI, но обратное событие не наблюдается.

События в жизни преимплантационного эмбриона: что влияет на время их наступления?

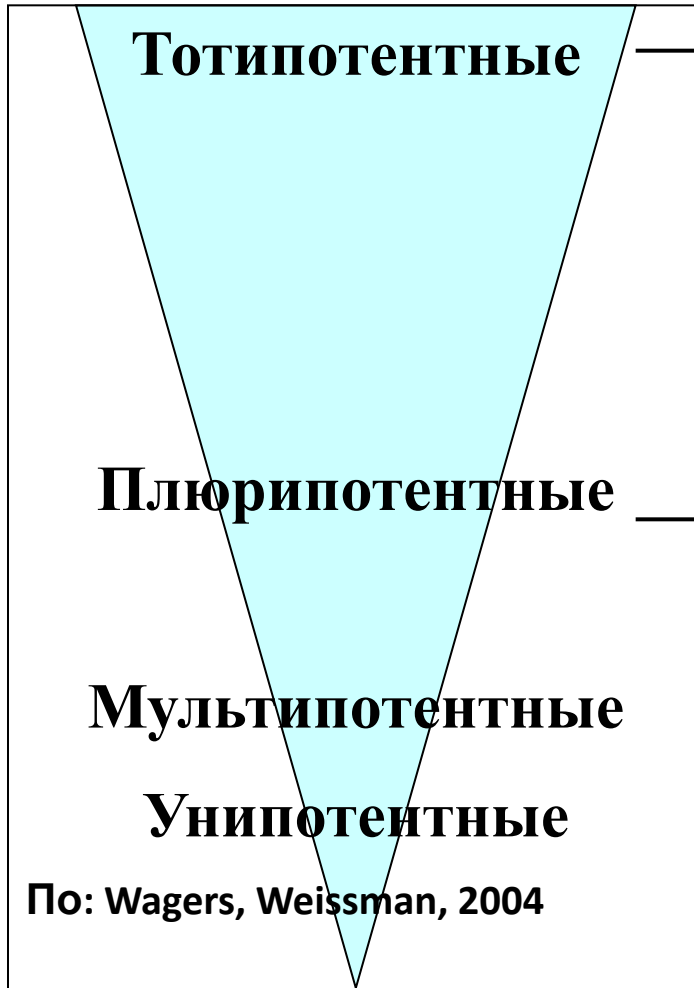


- Эмбрион разрезали на две половинки по эмбриональной – абэмбриональной оси (таких экспериментальных работ было много в 80-е годы – так пытались получать монозиготных близнецов))
- Эмбрионы восстанавливали поврежденные структуры, но оказывались значительно меньше размером.
- Последующие события у таких эмбрионов происходили в те же сроки, что у интактных.
- Но часть “половинных” эмбрионов погибала, так как у них было мало клеток эпибласта

Le Douarin and McLaren, 1984:
“внутренние часы” эмбриона
контролируют время наступления
стадий

Bischoff et al., 2008

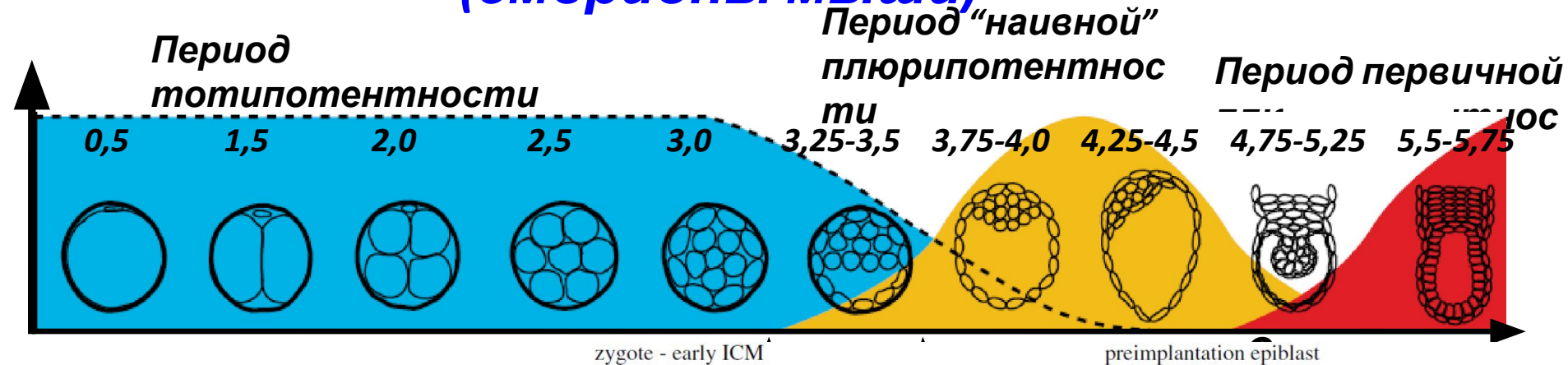
Изменение потентности клеток в преимплантационный и периимплантационный период



- **Тотипотентность** – способность развиваться как в клетки зародышевых, так и внезародышевых структур: *клетки эмбриона до компактизации ?*).
- **“Наивная” плюрипотентность** – способность клетки к самообновлению при сохранении потенциала к дифференцировке без подразделения на линии и способности принимать участие в развитии половых клеток (*эпибласт ВКМ поздней бластоцисты и эпибласт периимплантационного периода (до начала формирования зародышевого диска?)*).
- **Первичная плюрипотентность** – “наивные” клетки, утратившие способность к самообновлению: *клетки постимплантационного эпибласта (для некоторых клеточных линий) и клетки первичной полосы*.

Переход от тотипотенции к плюрипотенции у клеток ВКМ

(эмбрионы мыши)



Возможно, состояние “наивной” плюрипотентности (характерное для клеток эпибласта) необходимо для спецификации эпибласта.

